Einfluß von Lipidmembranen auf die Konformationsübergänge von Nukleinsäuren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernhard Brosius

aus Mainz

Düsseldorf

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0031

Einfluß von Lipidmembranen auf die Konformationsübergänge von Nukleinsäuren

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernhard Brosius

aus Mainz

Düsseldorf

1984

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Riesner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Weiss
Tag der Einreichung:	14. Mai 1984
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 1984

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Riesner, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Durch seine stete Diskussionsbereitschaft und viele praktische Tips trug er sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Dipl.-Biol. R. Hartmann und Herr Prof. Dr. W. Hillen präparierten die DNA - Restriktionsfragmente, mit welchen die entscheidenden Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden. Es ist mir eine besondere Freude, ihnen an dieser Stelle danken zu können.

Frau E. Ritt führte unter Beratung von Herrn Prof. Dr. W. Vogell die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. J. Galla und Herrn Prof. Dr. J. Seelig danke ich für die inspirierenden Diskussionen. Herrn Prof. Dr. J. Seelig danke ich außerdem für seine freundliche Betreuung während meines Aufenthaltes am Biozentrum der Universität Basel.

Herrn Dr. G. Steger danke ich für die Überlassung der verwendeten Programme zur Datenaufnahme und Datenauswertung. Ihm und Herrn Dipl.-Phys. W. Rappold danke ich außerdem für ihre Hilfestellungen bei der Arbeit am Computer.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Juni 1980 bis April 1984 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt und am Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. D. Riesner angefertigt.

Abkürzungsverzeichnis

α_i, β_i, γ_i	Rotationswinkel
Δg_{DD}	Dipol - Dipol - Wechselwirkungsenergie
Δg_{MD}	Dipol - Monopol - Wechselwirkungsenergie
ΔH_{bp}	Enthalpie für die Bildung eines Basenpaares beim Helixwachstum
ΔH_g	Gesamte Enthalpie
ΔH_v	Van't Hoff'sche Enthalpie
$\Delta T_{1/2}$	Halbwertsbreite
ΔT_m	Stabilisierung
$\Delta(\Delta T_{1/2})$	Verbreiterung
θ	Denaturierungsgrad
$\varkappa$	Abschirmkonstante
λ	Wellenlänge
μ	Dipolmoment
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μm	10^{-6} Meter
μmol	10^{-6} Mol
τ	Trübung
ψ	Potential
A	Extinktion
A	Adenosin
bp	Basenpaar
C	Cytidin
c	Konzentration
DDWW	Dipol - Dipol - Wechselwirkung
DMWW	Dipol - Monopol - Wechselwirkung
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
d	Durchmesser
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EPC	Phosphatidylcholin aus Eigelb

G	Gibbs'sche Energie
G	Guanosin
GUV	Giant unilamellar vesicles
H	Doppelhelix
H	Enthalpie
h	Stunde
I	Lichtintensität
I	Inosin
K	Gleichgewichtskonstante
K	Kelvin
kHz	10^3 Hertz
kJ	10^3 Joule
kV	10^3 Volt
LUV	Large unilamellar vesicles
Lyso - PC	Lysophosphatidylcholin
l	Optische Weglänge
MLV	Multilamellar vesicles
mA	10^{-3} Absorptionseinheiten
mg	10^{-3} Gramm
min	Minute
mM	10^{-3} Molar
mm	10^{-3} Meter
mmol	10^{-3} Mol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Zahl der Vesikel
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
n	Normalität
n	Brechungsindex
n	Anzahl der Basenpaare
n	Anzahl der Dipole
nm	10^{-9} Meter
nmol	10^{-9} Mol
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerol
PS	Phosphatidylserin
poly A	Polyadenylsäure
poly C	Polycytidylsäure
poly I	Polyinosylsäure
poly U	Polyuridylsäure

R	Gaskonstante
REV	Reverse - phase evaporation vesicles
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
r	Abstand
r	Radius
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Einzelstrang
SUV	Small unilamellar vesicles
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
T	Temperatur
T_m	Mittelpunktstemperatur des Helix - Knäuel - Überganges der Nukleinsäure
T_c	Phasenübergangstemperatur der Lipide
T	Thymidin
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V_e	Elutionsvolumen
w/w	Gewichtsanteil
x	Molenbruch

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Vorkommen und Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und Lipidmembranen	1
1.2.	Arbeitsplan	4
2.	Materialien und Methoden	6
2.1.	Verwendete Chemikalien und Puffer	6
2.2.	Dünnschichtchromatographie	7
2.3.	Quantitative Phosphatbestimmung	8
2.4.	Vorbereitung der Nukleinsäureproben	10
2.5.	Einschluß von Nukleinsäure in Vesikel	10
2.5.1.	Präparation der Vesikel	10
2.5.2.	Nukleasebehandlung	12
2.5.3.	Säulenchromatographie	13
2.6.	Nukleinsäure - Lipidextraktion	13
2.6.1.	Abtrennung der Nukleinsäure von Lipiden	13
2.6.2.	Bestimmung der in Liposomen eingeschlossenen Nukleinsäuremenge	13
2.6.3.	Wiederaufarbeitung von DNA	14
2.7.	Absorptionsspektroskopie	14
2.8.	Elektronenmikroskopie	14
2.9.	Thermische Denaturierung von Nukleinsäuren	15
3.	Theoretische Grundlagen	17
3.1.	Lipidmembranen	17
3.1.1.	Klassifikation der Liposomen	17
3.1.2.	Vesikelbildung	18
3.1.3.	Struktur der Phospholipide im Bilayer und ihre intermolekularen Wechselwirkungen	19
3.1.4.	Elektrische Eigenschaften von Phospholipid-bilayern	24
3.1.5.	Phasenübergänge von Phospholipiden	25
3.1.6.	Mischbarkeit von Lipiden und laterale Phasen-trennung	28
3.1.7.	Optische Eigenschaften der Vesikellösungen	29

		Seite
3.2.	Nukleinsäuren	30
3.2.1.	Der Helix - Knäuel - Übergang	30
3.2.2.	Elektrostatische Eigenschaften der Nukleinsäure und die Abhängigkeit des Helix - Knäuel - Überganges von der Ionenstärke	33
3.2.3.	Charakterisierung der verwendeten Nukleinsäuren	35
4.	Experimentelle Ergebnisse	36
4.1.	Charakterisierung der Vesikel	36
4.1.1.	Größenverteilung	36
4.1.2.	Gelchromatographie	37
4.1.3.	Stabilität	39
4.1.4.	Nukleinsäureeinschluß	40
4.1.5.	Extern adsorbierte Nukleinsäure	44
4.1.6.	Phasenübergänge des DPPC	45
4.2.	Thermische Denaturierung von Nukleinsäure in Lipidvesikeln	46
4.2.1.	Extinktionsmessung an trüben Lösungen	46
4.2.2.	Allgemeine Charakterisierung der thermischen Denaturierung von Nukleinsäure in Vesikeln	49
4.2.3.	Variation der Ionenstärke	55
4.2.4.	Variation der Kopfgruppen der Lipide	62
4.2.5.	Einfluß von Cholesterol	71
4.2.6.	Variation der Fettsäurezusammensetzung	73
5.	Diskussion	77
5.1.	Zur Methode	77
5.2.	Die Organisation der Nukleinsäuren im Vesikel	79
5.3.	Konzentrationseffekte	84
5.4.	Ein Modell zur Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran	86
5.5.	Die Verbreiterung des zweiten Überganges	96
5.6.	Abschließende Betrachtungen	98
6.	Zusammenfassung	102
7.	Literaturverzeichnis	105

1. Einleitung

1.1. Vorkommen und Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und Lipidmembranen

In der Natur sind Nukleinsäuren nicht nur mit Proteinen, sondern teilweise auch mit Membranen assoziiert. Bisher wurden drei verschiedene Klassen von Nukleinsäure - Membran - Wechselwirkungen beschrieben. Es sind dies die Verankerung des bakteriellen Genoms in der Zellmembran, die Vergesellschaftung von mRNA mit Membransystemen und die Bindung von Ribosomen an die Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Während für den letzteren Fall die Bindung der Ribosomen an ein Glykoprotein der Membran nachgewiesen wurde (1,2) und bei der Bindung der mRNA an das endoplasmatische Retikulum die Bindung der RNA an Proteine ebenfalls entscheidend ist (3), wurde für die Kompartimentierung der maternalen mRNA in Membranlamellen der Oocyten von Xenopus laevis (4) die Art der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran wohl modellhaft diskutiert (5), aber noch nicht experimentell untersucht. (Die Artikel (4) und (5) erschienen erst während der Anfertigung dieser Arbeit.) Für die Existenz des DNA - Membrankomplexes in der bakteriellen Zelle hingegen ist die entscheidende Rolle der Lipide nachgewiesen. Zwar enthält dieser Komplex neben DNA - Polymerase III (6) auch spezifische Bindungsproteine (7), er zerfällt jedoch nur dann, wenn durch Detergenzzusatz (8) oder Phospholipase C - Behandlung (9) die Lipide entfernt werden. Darüberhinaus ist die gebundene DNA in Anwesenheit der Lipide sowohl vor großen Scherkräften (10) als auch vor Nukleaseabbau (11) geschützt. Bereits 1971 wies M.J.Daniels nach, daß die Lipidzusammensetzung der DNA - assoziierten Membran von der mittleren Lipidzusammensetzung der übrigen Membran dadurch abweicht, daß im Komplex dipolare Lipide angereichert und negativ geladene Lipide unterdurchschnittlich vertreten sind (11). Es ist aber bisher noch nicht gelungen, den Einfluß der Proteine auf die Nukleinsäure von der Beeinflussung durch die Lipide zu trennen.

Während die Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen einerseits und Proteinen und Lipidmembranen ander-

erseits ein ausgedehntes Feld intensiver physikalischer und biochemischer Forschungstätigkeit darstellen, ist über die Wechselwirkung von Nukleinsäuren mit Lipidbilayern nur wenig bekannt, so daß Untersuchungen auf diesem Gebiet auch von grundsätzlichem Interesse sind. Mit physikalischen Methoden untersuchte man bisher nur die Ligandenbindung von einzelnen Lipidmolekülen an die DNA - Doppelhelix (12). Hierbei wurde die thermische Stabilität der DNA - Doppelhelix in Anwesenheit von Lipiden gemessen. Um die Bildung geschlossener Bilayer, die zu einer Trübung der Lösung geführt hätten, zu verhindern, wurden die Messungen in 51%igem Methanol durchgeführt. Bei niedrigen Lipidkonzentrationen fand man eine Stabilisierung, bei höheren eine Destabilisierung der DNA - Doppelhelix. Man schloß hieraus auf die Existenz sowohl einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen der Lipide und dem Phosphatrückgrat der DNA als auch auf eine hydrophobe Wechselwirkung durch Bindung der Fettsäureketten in den Furchen der DNA - Doppelhelix (12,13). Die Wechselwirkung von Nukleinsäuren mit Lipiden in einer der Wirklichkeit nahekommenden Membranstruktur wurde bisher noch nicht untersucht; es wurde aber berichtet, daß Nukleinsäure an Phosphatidylcholinmembranen gebunden werden kann (14).

Membranen sind <u>in vitro</u> gut handhabbar als Lipidvesikel - sogenannte Liposomen - , sphärisch geschlossenen Lipidbilayern, die einen Bereich des wässrigen Mediums vollständig umschließen und gegen die Umgebung abgrenzen. Daher ist es möglich, Substanzen - wie z.B. Nukleinsäuren - in Liposomen in so hohen Konzentrationen einzuschließen, daß eine möglicherweise auftretende Wechselwirkung meßbar wird. Abb. 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Lipidvesikeln (vgl. Kap. 2.8. und Kap. 4.1.1.), Abb. 2 zeigt mögliche Formen der Organisation der Nukleinsäure in den Vesikeln.

Die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Lipidbilayern wird zunehmend von anwendungsbezogenem Interesse. Nukleinsäure, in Lipidvesikel eingeschlossen, ist vor Nukleaseabbau geschützt und kann durch Fusion der Vesikel mit der Zellmembran leicht in Zellen eingebracht werden (15). Mit dieser Methode gelangen zum Beispiel die Einschleusung

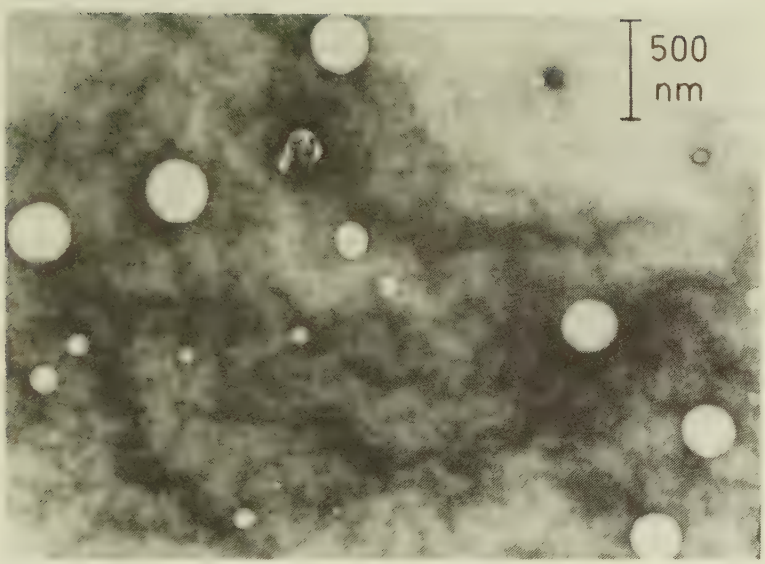

Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln.
Vgl. Kap. 2.8. und 4.1.1.

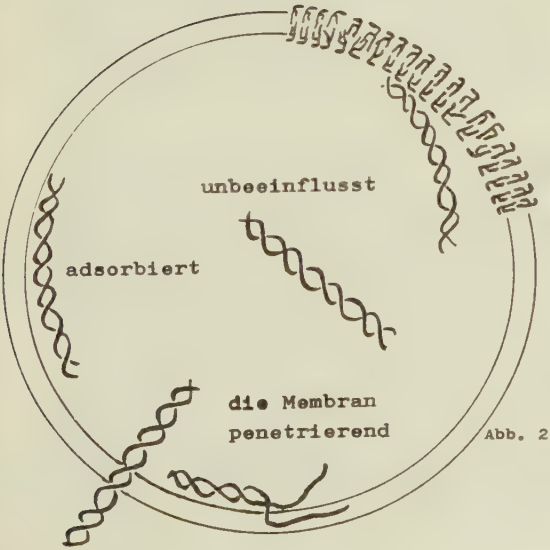

Abb. 2 Mögliche Anordnung der Nukleinsäuremoleküle im Vesikel. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgerecht.

von pBR322 in E. coli (16) und in Chloroplasten von Vigna sinensis (17), die Infektion von Hamsterzellen mit Poliovirus, das ansonsten nur Primatenzellen infizieren kann (18) und sogar die Einschleusung von kompletten Chromosomen in Zellen aus Zellkulturen (19). 1980 konnte zum ersten Male ein prokaryotisches Gen in Eukaryontenzellen zur Expression gebracht werden, indem das β - Lactamasegen aus pBR322 von E. coli, in Lipidvesikel eingeschlossen, zur Transformation von Hühnerembryo - und HeLa - Zellen führte (20). Auch wenn erst während der Anfertigung dieser Arbeit 1981 Artikel erschienen, in welchen Methoden beschrieben wurden, durch deren Anwendung die liposomenvermittelte Zelltransformation etwa so effizient wird wie die Transformation unter Einsatz von DEAE - Dextran (21,22), so sind Liposomen doch die einzigen Vehikel, mit denen eine Zelltransformation in vivo durchgeführt werden kann. So gelang es bereits 1974, durch Injektion von lipidumschlossenen poly I·poly C - Doppelsträngen, Mäuse zur Interferonproduktion anzuregen (23). Während der Anfertigung dieser Arbeit erschien 1983 ein Artikel von Nicolau et al., in dem beschrieben wurde, daß nach der intravenösen Injektion von in Vesikeln eingeschlossenem Insulingen in Ratten in deren Leber die Expression von Insulin nachweisbar war (24). Somit ist es auch von der anwendungsbezogenen Seite her von Interesse, zu wissen, in welchem Zustand die Nukleinsäure in Lipidvesikeln vorliegt, und ob die Lipidmembran einen Einfluß auf die Nukleinsäure ausübt.

1.2. Arbeitsplan

Wie in Kap. 1.1. dargestellt, ist die Untersuchung der Wechselwirkung von Lipidmembranen und Nukleinsäuren sowohl von grundsätzlichem als auch von anwendungsbezogenem Interesse. Da Lipidvesikel überdies leicht und über weite Konzentrationsbereiche herstellbar sind und gleichzeitig große Mengen an Nukleinsäuren einschließen können (21, 25), ist der Einfluß der Lipidmembran auf Nukleinsäure am besten durch Messung des Verhaltens der Nukleinsäure in Liposomen zu messen. Methodisch sollte der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Denaturierungsverhaltens eingeschlossener im Vergleich zum Denaturierungsverhalten freier Nukleinsäure

liegen, da der Prozeß des Helix - Knäuel - Überganges von Nukleinsäuren empfindlich von vielen Parametern abhängt und sich sehr genau messen läßt.

Die Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung des Systems aus Vesikeln und Nukleinsäure nach Größenverteilung, Einschluß und Stabilität und die Messung der Beeinflussung des Helix - Knäuel - Überganges durch die Lipidmembran. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit, die Messungen an Nukleinsäurestücken definierter und einheitlicher Länge und Sequenz durchzuführen. Speziell die Frage nach zu erwartenden elektrostatischen Beiträgen zur Wechselwirkung (12,13,14) bedingte die spezifische Wahl der Lipide, aus welchen die Vesikel aufgebaut werden sollten. So ist zu erwarten, daß sich elektrostatische Wechselwirkungen speziell bei dipolaren Lipiden wie Phosphatidylcholin bemerkbar machen (14) und durch Zugabe von negativ geladenen Lipiden wie Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol variiert werden könnten. Elektrostatische Kräfte lassen sich überdies nachweisen durch Untersuchung des Helix - Knäuel - Überganges der Nukleinsäure bei verschiedenen Ionenstärken des Mediums. Erstrebenswert ist natürlich, die Gesamtheit der Ergebnisse in einem molekularen Modell zu interpretieren.

Es war abzusehen, daß drei methodische Schwierigkeiten zu überwinden waren: die Messung des Denaturierungsverhaltens von Nukleinsäuren in trüben Lösungen, der Einsatz von definierten DNA - Stücken in hohen Konzentrationen und die Minimierung der Vesikelpräparation auf kleine Volumina. Über große Temperaturbereiche mußten Nukleinsäuredenaturierungskurven mit großer Genauigkeit gemessen, gespeichert und rechnerisch ausgewertet werden (siehe G. Steger (26)), wobei die Absorptionseffekte der Nukleinsäure von Trübungseffekten der Vesikel separiert werden mußten. Definierte DNA - Fragmente wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W.Hillen und Frau Dipl.-Biol. R.Hartmann im Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Hochschule Darmstadt, präpariert und mir zur Verfügung gestellt. Die Bedingungen der Vesikelpräparation mußten soweit geändert werden, daß mit 100 µl Lösung gearbeitet werden konnte.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Puffer

Lipide

Cardiolipin (Bovine heart;Sodium salt),
L - α - Phosphatidylcholin (Egg yolk; Typ V - E),
L - α - Dipalmitoylphosphatidylcholin (Grade TLC) und
L - α - Dioleoylphosphatidylcholin wurden von Sigma GmbH, München, bezogen,
Stearinsäure und Cholesterol von Merck, Darmstadt, und
L - α - Phosphatidylserin (Bovine brain) und
L - α - Phosphatidyl - DL - Glycerol (Egg; Sodium salt)
von Calbiochem GmbH,Hoechst.

DNA - Fragmente und RNA

DNA - Fragmente,
179 bp Länge, 56% GC - Gehalt, kloniert aus pVH51, und
187 bp Länge, 38% GC - Gehalt, kloniert aus pWH106
wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W.Hillen und Frau Dipl.-Biol. R.Hartmann zur Verfügung gestellt. Zur genaueren Charakterisierung siehe Kap. 3.2.3.

Die lyophilisierten Kaliumsalze der Polyadenylsäure (poly A) und Polyuridylsäure (poly U), sowie tRNA aus Bierhefe wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Enzyme

Ribonuklease A aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.27.5) und Pronase aus Streptomycetes griseus wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen, DNase I (E.C. 3.1.21.1) aus Rinderpankreas von Worthington Biochemical Corporation, New Yersey.

Andere Chemikalien

Ethanolfällungen von Nukleinsäuren wurden mit destilliertem technischem Ethanol durchgeführt. Sämtliche verwendeten Chemikalien und organische Lösungsmittel hatten den Reinheitsgrad p.a. und wurden von Merck, Darmstadt, oder Sigma GmbH, München, bezogen. Für die Schutzgasatmosphäre beim Arbeiten mit Lipiden wurde Stickstoff - 99,999% - von Messer Griesheim GmbH, Frankfurt, verwendet.

Puffer

Alle Versuche wurden mit einem Standardpuffer durchgeführt:

1,0 mM Natriumkakodylat

0,1 mM EDTA

pH = 7,4 , eingestellt mit NaOH.

Die Ionenstärke wurde mit NaCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Pufferlösungen wurden mit hochreinem Milli - Q - Wasser (Millipore GmbH, Neu Isenburg) angesetzt, anschließend zur Entfernung von Staubteilchen durch ein 0,22 µm Membranfilter (GSWP, Millipore GmbH) filtriert und 30 min bei 130°C autoklaviert.

2.2. Dünnschichtchromatographie

Die Reinheit der Lipide wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (27). Zum Test auf Verunreinigung durch Lysolipid wird Laufmittel 1 (siehe unten) verwendet (Abb. 3a). Da für dieses Laufmittel alle verwendeten zweikettigen Phospholipide ähnliche R_f - Werte haben (Abb. 3b), wird eine zweite Dünnschichtplatte mit Laufmittel 2 (siehe unten) entwickelt, um auf Verunreinigung durch andere zweikettige Phospholipide zu testen (Abb. 3c). Aufgetragen wurden jeweils 1 µmol Lipid, bei der Reinheitsprüfung von DOPC 1 µmol und 3 µmol. Die Positionen der Lipide nach der Chromatographie wurden in einer Joddampfatmosphäre sichtbar gemacht. Lipidproben, die nach der Dünnschichtchromatographie in einem der beiden Laufmittel mehr als einen Flecken zeigten, wurden verworfen.

Laufmittel 1:	Laufmittel 2:
65 ml Chloroform	25 ml Chloroform
25 ml Methanol	15 ml Methanol
4 ml Wasser	4 ml Eisessig
	2 ml Wasser

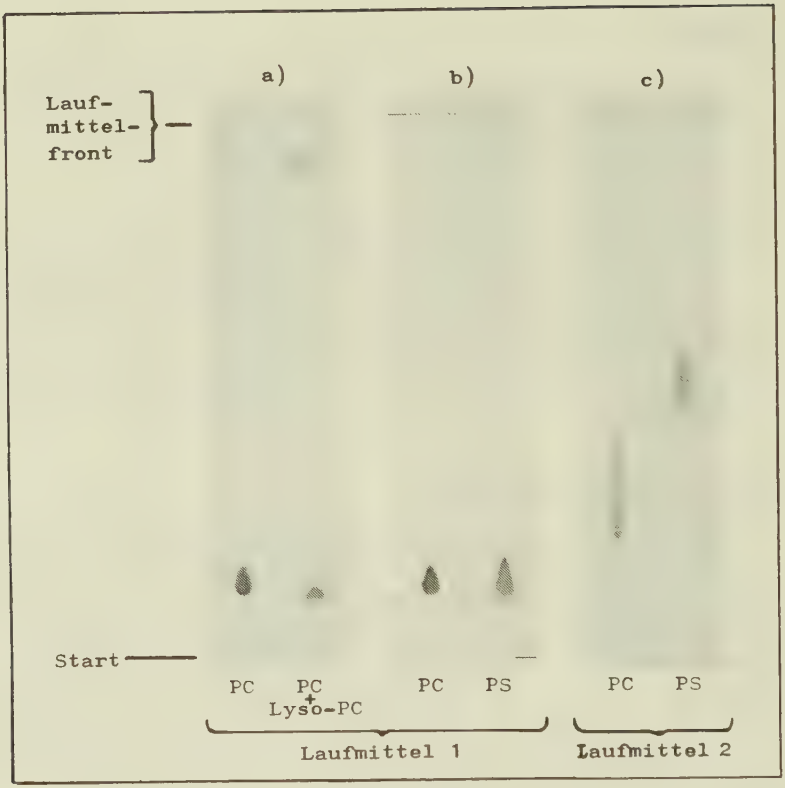

Abb. 3 Dünnschichtchromatographie der Lipide
a) Phosphatidylcholin PC und Lysophosphatidylcholin enthaltendes Phosphatidylcholin in Laufmittel 1.
b) Phosphatidylcholin PC und Phosphatidylserin PS in Laufmittel 1.
c) Phosphatidylcholin PC und Phosphatidylserin PS in Laufmittel 2.

2.3. Quantitative Phosphatbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von Lipidkonzentrationen wurde der Phosphatgehalt bestimmt nach einer geringfügig geänderten Vorschrift von B.N.Ames und D.T.Dubin (28). Zum Phosphatnachweis wird zuerst die organische Substanz unter Einsatz von Nitrat quantitativ oxidiert. Entstehende Polyphosphate werden mit Salzsäure hydrolysiert. Unter Ver-

wendung von Molybdat entstehen nach milder Reduktion mit Ascorbat hochmolekulare, kolloidale Mischoxide von tiefblauer Farbe.

Duran Reagenzgläser (16 mm x 160 mm, Schott, Mainz) werden mit 10%iger Salzsäure ausgekocht. Zur Erstellung einer Eichgeraden werden aus einer Stammlösung von 1 mM KH_2PO_4 jeweils 0, 10, 30, 50, 70, 90 µl Lösung (entsprechend nmol Phosphat) in ein Reagenzglas pipettiert und mit Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lipidproben sind in Chloroform gelöst. Es wird von jeder Probe soviel in je ein Reagenzglas pipettiert, daß die Lipidmenge 100 nmol nicht überschreitet. Nach der vorsichtigen Vertreibung des Chloroforms im Stickstoffstrom wird mit 100 µl Wasser aufgefüllt. Alle Lösungen werden nach der folgenden Vorschrift gleich behandelt:

Nach Zugabe von drei Tropfen Magnesiumnitratlösung ($Mg(NO_3)_2$, 10%ig gelöst in Ethanol p.a., w/w) wird die Flüssigkeit in den Reagenzgläsern unter heftigem Schütteln über dem Bunsenbrenner eingedampft. Die Reagenzgläser werden nach der NO_2 - Entwicklung solange ausgeglüht, bis nur noch eine reinweiße Asche zurückbleibt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird jeweils 0,6 ml 1n HCl zugegeben. In einem Becherglas wird Wasser zum Kochen gebracht und die Reagenzgläser werden, durch aufgesetzte Glasmurmeln verschlossen, 15 min in kochendem Wasser erhitzt. In dieser Zeit wird eine 10%ige Ascorbatlösung in Wasser angesetzt. Diese Lösung mischt man mit dem sechsfachen Volumen Molybdatlösung (siehe unten) und pipettiert nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur je 1,4 ml dieser Mischung zu jeder Probe. Nach 1 h Inkubation bei 50°C wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 820 nm bestimmt, wobei die Probe ohne Phosphat als Referenz dient.

Die Durangläser dürfen nur einmal verwendet werden, und für jede Konzentrationsbestimmung muß eine Eichgerade mit erstellt werden.

Molybdatlösung: 0,42% Ammoniummolybdat in 1n Schwefelsäure w/w, entsprechend 1,05 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ in 250 ml 1n H_2SO_4.

2.4. Vorbereitung der Nukleinsäureproben

tRNA wird in 0,5 ml 1n Natriumacetatlösung gelöst und mit 0,5 ml gesättigtem Phenol - Wasser 5 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wird die obere Phase mit 0,5 ml gesättigtem Phenol - Wasser und 0,5 ml Chloroform geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wird die obere Phase fünfmal mit 1 ml Ether extrahiert und anschließend die tRNA mit 1 ml Ethanol 1h bei -20°C gefällt. Es wird zentrifugiert und das Pellet dreimal mit Ethanol durch Resuspension und Zentrifugation gewaschen. Nach dem letzten Verwerfen des Überstandes wird anhaftendes Ethanol im Vakuum entfernt und die tRNA in 1 ml Standardpuffer (50 mM NaCl) gelöst. Die Lösung wird auf die gewünschte tRNA - Konzentration eingestellt und eingefroren.

Poly A·poly U - Lösungen werden angesetzt, indem lyophilisiertes poly A und poly U in je ein ausgeheiztes Glasröhrchen transferiert werden. Jede Probe wird in 1,5 ml Standardpuffer (50 mM NaCl) gelöst und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Um die Bildung von Tripelsträngen zu vermeiden, muß poly A im Überschuß eingesetzt werden. Unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten folgt, daß auf eine A_{260} - Einheit poly A genau 0,865 A_{260} - Einheiten poly U verwendet werden sollen. Die Mischung aus poly A und poly U wird auf 70°C erhitzt und im Verlaufe einer Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wird auf eine Konzentration von 200 A_{260}/ml eingestellt, in 1 ml - Portionen abgefüllt und eingefroren.

DNA wird 24h gegen Standardpuffer (10 mM NaCl) in nach (29) vorbehandelten Dialyseschläuchen dialysiert. Der Puffer wird viermal gewechselt. Nach der Beendigung der Dialyse wird die DNA - Lösung auf 25 A_{260}/ml verdünnt, in 100 µl - Portionen abgefüllt und eingefroren.

2.5. Einschluß von Nukleinsäure in Vesikel

2.5.1. Präparation der Vesikel

SUV (Small unilamellar vesicles, vgl. Kap. 3.1.1.) werden nach einer Varianten der Methode von Huang (30) hergestellt. 10 µmol Lipid, in ca. 2 ml Chloroform gelöst, werden unter Schutzgasatmosphäre in einen 10 ml Rundkolben gefüllt. Am

Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel entfernt. Das Lipid wird in 5 ml Benzol gelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend lyophilisiert (31). Danach wird das Lipid am Rotationsverdampfer bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre in 1 ml Standardpuffer suspendiert. Nach 10 min Schütteln mittels Vortex bei verschiedenen Frequenzen entsteht eine weiße, undurchsichtige Suspension multilamellarer Vesikel. Diese wird in einem Ultraschallbad Branson B220 bei 50 kHz, 25°C, 7 bis 10 h beschallt. Die Lösung zeigt dann eine bläuliche Opaleszenz ohne Trübung. Restliche multilamellare Vesikel entfernt man gelchromatographisch.

REV (Reverse - phase evaporation vesicles, vgl. Kap. 3.1.1.) aus Lipiden, die bei Zimmertemperatur oberhalb des Phasenüberganges vorliegen, werden nach einer Abwandlung der Wilschut - Varianten (32) der Methode von Szoka und Papahadjopoulos (25) hergestellt. Die Abwandlungen waren notwendig, um die Präparationen mit 100 µl Puffer oder Nukleinsäurelösung problemlos durchführen zu können.

0,6 µmol Lipid, in ca. 100 µl Chloroform gelöst, werden unter Stickstoffatmosphäre in einen 2 ml - Spezialkolben pipettiert. Nach dem Verdampfen des Chloroforms im Rotationsverdampfer am Wasserstrahlvakuum wird der Lipidfilm in 500 µl Diethylether gelöst und es werden 100 µl Puffer oder Nukleinsäurelösung zugegeben. Die Nukleinsäurelösungen sollen 25 A_{260}/ml Nukleinsäure enthalten. Im Ultraschallbad (Branson B220) wird bei 50 kHz, 20°C, 90 sec lang beschallt. Der Kolben wird am Rotationsverdampfer am Wasserstrahlvakuum bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit bis zum Entstehen eines stabilen Gels evakuiert. Nach kurzem Begasen mit Stickstoff evakuiert man bei verringerter Rotationsgeschwindigkeit bis zur Phasentrennung weiter. Durch kurzzeitiges, anschließendes Schütteln mittels Vortex zerfällt das Gel in der wässrigen Phase. Zum Schluß wird der Kolben am Rotationsverdampfer bei minimaler Rotationsgeschwindigkeit bis 15 min nach Ende der Blasenbildung evakuiert. Die anschließende Gelchromatographie ist in Kap. 2.5.3. und Kap. 4.1.2. beschrieben.

Besonders zu beachten ist, daß bei der Präparation von SUV und REV alle Präparationsschritte unter einer Stickstoffatmosphäre vollzogen werden müssen.

Vesikel aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), das bei Zimmertemperatur unterhalb der Phasenumwandlung (vgl. Kap. 3.1.5.) vorliegt, werden nach einer Varianten der von Szoka und Papahadjopoulos beschriebenen Methode (25) präpariert. Folgende weitreichende Abwandlungen der ursprünglichen Vorschrift waren nötig, um Vesikel zu erhalten, die in einem eindeutigen und definierten Zustand vorliegen:

0,6 µmol DPPC werden in einem 2 ml - Spezialkolben in 160 µl Chloroform und 160 µl Diisopropylether gelöst und mit 100 µl Puffer oder Nukleinsäurelösung (25 A_{260}/ml) versetzt. Der Kolben wird 2 min im Wasserbad bei 50°C ultrabeschallt (Branson B220, 50 kHz) und anschließend am Rotationsverdampfer bei 50°C evakuiert. Nachdem das starke Schäumen der Mischung abgeklungen ist, werden erneut 100 µl auf 50°C erwärmter Puffer oder Nukleinsäurelösung zugegeben. Es wird kurz geschüttelt und bis zum Ende der Gasentwicklung weiter bei 50°C evakuiert. Danach wird die Lösung 1 h bei 50°C inkubiert. Im Laufe einer weiteren Stunde läßt man den Kolben in einem Becherglas mit heißem Wasser auf Raumtemperatur abkühlen und hält ihn anschließend 1 h bei 4°C. Die Säulenchromatographie sollte ebenfalls bei 4°C stattfinden. Wird die Präparation zur thermischen Analyse verwendet (vgl. Kap. 2.9. und Kap. 4.2.6.), so soll die Probe vor Beginn der Aufheizung 1 h bei 25°C relaxieren.

2.5.2. Nukleasebehandlung

Wird die Vesikelpräparation nach Kap. 2.5.1. in Anwesenheit von poly A·poly U durchgeführt, so muß anschließend nicht eingeschlossene Nukleinsäure enzymatisch degradiert werden, da eine gelchromatographische Trennung von Liposomen und poly A·poly U - Doppelsträngen nicht möglich ist (vgl. Kap. 4.1.2.). Hierzu wird nach (33) die RNA - haltige Vesikellösung 30 min mit 60 µg/ml RNase A inkubiert. Anschließend wird die RNase zerstört durch 30 min Inkubation mit 2 mg/ml vorinkubierter Pronase. Die Fragmente können von den Liposomen gelchromatographisch abgetrennt werden.

Wenn eine Probe mit DNase behandelt werden soll, wird die DNA - haltige Lösung mit 2 units/ml DNase I bei 1 mM $MgCl_2$ 30 min lang inkubiert. Gestoppt wird mit 2 mM EDTA.

2.5.3. Säulenchromatographie

Als Material für die Gelchromatographie wurde Sepharose - CL - 2B zur Trennung von Vesikeln und nicht eingeschlossenem Material gewählt. Für ein Auftragsvolumen von 100 µl hatte die Säule einen Durchmesser von 4,5 mm und eine Länge von 15 cm. Die Flußgeschwindigkeit wurde auf 100 µl/min eingestellt. Das Ausschlußvolumen wurde bestimmt zu 1,0 ml, das Bettvolumen zu 2,8 ml. Detektiert wurde mit einem LKB - Uvikord - S - Detektor bei einer Wellenlänge von 278 nm, angeschlossen war ein Einkanal - LKB - Schreiber, Typ 2210. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionenkollektor (Multirac, LKB - GmbH, München) gesammelt.

2.6. Nukleinsäure - Lipidextraktionen

2.6.1. Abtrennung der Nukleinsäure von Lipiden

Zur quantitativen Bestimmung von in Liposomen eingeschlossener Nukleinsäure und zur Reinigung bereits verwendeter DNA zur Wiederverwendung ist jeweils eine Trennung von Lipid und Nukleinsäure durch Extraktion der Lipide mit organischen Lösungsmitteln notwendig. Hierzu wird die wässrige Nukleinsäure - Lipid - Suspension 10 min mit dem 1,2 fachen Volumen Chloroform und dem 2,4 fachen Volumen Methanol gerührt. Es bildet sich ein einphasiges System. Danach werden 1,8 Volumenteile Wasser und 1,8 Volumenteile Chloroform bezüglich des Volumens der anfänglichen wässrigen Lösung zugegeben und weitere 10 min gerührt. Anschließend trennt man die Suspension durch 10 min Zentrifugation bei 4200 rpm in einer Heraeus - Christ - Zentrifuge auf. In der oberen Methanol - Wasser - Phase ist die Nukleinsäure gelöst, in der unteren Methanol - Chloroform - Phase das Lipid (34).

2.6.2. Bestimmung der in Liposomen eingeschlossenen Nukleinsäuremenge

Von den nach Kap. 2.5.1. hergestellten Liposomen wird nicht eingeschlossene DNA säulenchromatographisch abgetrennt, nicht eingeschlossene RNA wird enzymatisch degradiert und die Fragmente von den Liposomen chromatographisch abgetrennt (vgl.

Kap. 2.5. und Kap. 4.1.2.). Die Liposomenfraktionen werden gesammelt und Nukleinsäure und Lipide nach Kap. 2.6.1. getrennt. Nach Einengen der beiden Phasen bestimmt man die Nukleinsäuremenge optisch durch Absorptionsmessung (vgl. Kap. 2.7.), die Lipidmenge durch quantitative Phosphatbestimmung (vgl. Kap. 2.3.).

2.6.3. Wiederaufarbeitung von DNA

Nach der säulenchromatographischen Abtrennung der nicht eingeschlossenen DNA von den Liposomen werden die DNA - Fraktionen gesammelt. Um eventuell vorhandene Verunreinigungen durch Lipide zu beseitigen, wird nach Kap. 2.6.1. verfahren. Die wässrige Phase wird eingeengt und nach Kap. 2.4. phenolisiert, aber ohne Ethanolfällung. Dann wird nach Kap. 2.4. dialysiert und erst danach mit dem dreifachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Lösung ist 100 mM an NaCl, bezogen auf das Gesamtvolumen.

2.7. Absorptionsspektroskopie

Absorptionsmessungen wurden mit dem Beckman - Doppelstrahl-Spektralphotometer UV 5260 mit 0,5 nm/sec aufgenommen. Die Schichtdicke in der Küvette betrug 1 cm. Für die Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäure wurde mit 40 $\mu g/A_{260}$ gerechnet.

2.8. Elektronenmikroskopie

Zur Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden Vesikelpräparationen in Standardpuffer bei 10 mM NaCl durchgeführt. Nach der Säulenchromatographie wird ein Tropfen Lösung auf ein 300 mesh Grid (3 mm Durchmesser, Kupfer, formvarbeschichtet und frisch mit Kohle bedampft) aufgegeben und 1 min gewartet. Danach wird ein Tropfen einer Uranylacetatlösung (1%, pH = 4,8) zugegeben. Eine Minute später saugt man die Lösung mit Filterpapier ab. Polyphosphorwolframsäure eignete sich nicht als Kontrastierungsmittel.

Die EM - Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau E.Ritt unter Beratung von Herrn Prof. W.Vogell, Institut für Biophysik, Universität Düsseldorf, an einem EM 400T (Philips,

Eindhoven - Netherlands) gemacht. Die Anodenspannung betrug 80 kV.

2.9. Thermische Denaturierung von Nukleinsäuren

Die thermische Denaturierung von Nukleinsäuren und das Verhalten der Vesikel bei Temperaturerhöhungen wurde in einem Zweiwellenlängen — Spektralphotometer Sigma ZWS 11 (Biochem, München) gemessen. Das Gerät wurde speziell für diese Arbeit angeschafft aus Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein - Westfalen. Der Photomultiplier ist gegen Temperaturschwankungen auf 30°C thermostatisiert. Die Temperatur der Meßküvette wird über einen thermostatisierten Küvettenhalter eingestellt und über einen NTC - Widerstand gemessen. Die Registrierung der Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen und der Temperatur sowie die Steuerung des Thermostaten erfolgt über einen Mikrocomputer (Apple II, 64 kB RAM, 12 bit Digital - Analog - Wandler, Interface von Technosystem, Edingen - Neckarhausen). Der Aufbau der Apparatur ist in Abb. 4 dargestellt.

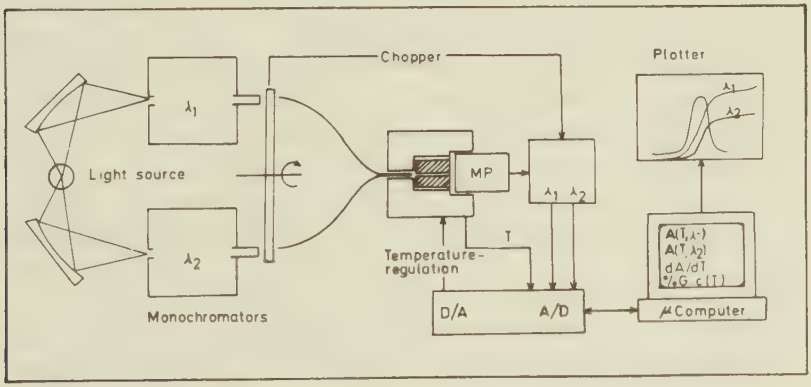

Abb. 4 Instrument zur Aufnahme thermischer Denaturierungsprofile. Im Zweiwellenlängen - Spektralphotometer Sigma ZWS 11 wird das Licht aus beiden Monochromatoren über eine Glasfaseroptik zum Küvettenhalter geleitet und vom gleichen Photomultiplier gemessen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei Messungen an poly A·poly U wurde mit 0,2°C/min, bei Messungen an DNA mit 0,3°C/min aufgeheizt. Absorptions - und Temperaturwerte werden mit einer Rate von 15 Punkten pro Grad Celsius registriert und auf einer Diskette abgespeichert. Zur ausführlichen Beschreibung des Systems sowie der verwendeten Programme siehe G.Steger (26). Die gespeicherten Absorptionsprofile werden elektronisch geglättet und differenziert durch lineare Interpolation über sieben Datenpunkte entsprechend 0,5°C. Die Kurven werden mit einem XY - Schreiber (Hewlett - Packard 7047A) gezeichnet.

Soweit im Text nicht anders vermerkt, werden zur Messung Halbmikroküvetten der Firma Hellma (Müllheim,Baden) verwendet, die eine optische Weglänge von 1 cm und ein Volumen von 600 µl aufweisen. Da Vesikellösungen nicht mit Helium behandelt werden können, muß zur Vermeidung von Luftblasenbildung bei hohen Temperaturen bereits der Puffer für die Gelchromatographie im Vakuum entlüftet und anschließend mit Helium begast werden. Die Küvette wird mit einem durchbohrten Teflonstopfen so verschlossen, daß sie vollständig mit Flüssigkeit gefüllt ist.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Lipidmembranen

3.1.1. Klassifikation der Liposomen

Zur Beschreibung von Lipidvesikeln wurde 1978 auf dem "Meeting on liposomes and their use in biology and medicine" in New York eine allgemein verbindliche Nomenklatur geschaffen (35).

Alle Typen geschlossener Bilayer, die einen wässrigen Bereich vollständig umschließen, werden "Vesikel" oder "Liposomen" genannt. Die Einteilung der Vesikel in Klassen erfolgt gemäß der Anzahl der Bilayer und der Größe der Vesikel. Vesikel aus mehreren Bilayern werden als MLV ("Multilamellar vesicles") bezeichnet. Werden die Liposomen nur aus einem Bilayer gebildet, so lautet ihre Bezeichnung SUV ("Small unilamellar vesicles") bei einem Durchmesser von weniger als 100 nm, LUV ("Large unilamellar vesicles") bei Durchmessern zwischen 100 nm und 10 µm und GUV ("Giant unilammellar vesicles") bei Durchmessern darüber (36). Da LUV normalerweise einen Durchmesser von etwa 1 µm haben und die nach Kap. 2.5. unter Einsatz organischer Lösungsmittel hergestellten Vesikel mit einer Größenverteilung zwischen 80 nm und 300 nm zwischen SUV und LUV liegen, war es bis 1981 üblich, diese spezielle Untergruppe der LUV nach der Herstellungsmethode als REV ("Reverse - phase evaporation vesicles") zu bezeichnen(25), um ihre Sonderstellung deutlich werden zu lassen. Obwohl es zunehmend üblich wird, sie ebenfalls als LUV zu bezeichnen, möchte ich in dieser Arbeit die alte Nomenklatur beibehalten.

Vesikel aus Lipiden unterhalb des Phasenüberganges (vgl. Kap. 3.1.5.) werden "fest" genannt, oberhalb des Phasenüberganges "flüssig". Die Phasenübergangstemperatur wird als T_c bezeichnet.

In dieser Arbeit wird für die Bezeichnung der Lipide folgende Nomenklatur verwendet: Phosphatidylglycerol PG, Phosphatidylserin PS, Phosphatidylcholin PC, speziell : PC aus Eigelb (Egg - yolk) EPC, Dipalmitoylphosphatidylcholin DPPC, Dioleoylphosphatidylcholin DOPC.

3.1.2. Vesikelbildung

Wesentlich für den Zusammenhalt von Vesikeln und Micellen sind die Attraktionskräfte der hydrophoben Wechselwirkung der Kohlenwasserstoffketten, der Oberflächenspannung des Wassers, der van der Waals - Wechselwirkung der Fettsäureketten und spezifischer Wechselwirkungen der Kopfgruppen, sowie die Repulsion durch elektrostatische und sterische Abstoßung von Kopfgruppen und die sterische Abstoßung im Kohlenwasserstoffbereich (37). Wie sich berechnen läßt, können in wässrigem Medium nur einkettige Amphiphile wie freie Fettsäuren oder Lysolipide zu Micellen aggregieren (38), während zweikettige Phospholipide mit hinreichend langen Fettsäuren (d.h. mehr als zehn Kohlenstoffatomen) zu Bilayern aggregieren (39).

Suspendiert man Lipid in Puffer, so existieren lokal hohe Lipidkonzentrationen, so daß Wechselwirkungen zwischen den Bilayern auftreten (38). Es bilden sich multilamellare Vesikel (MLV) mit großen Radien (40). Durch Ultrabeschallung werden Bilayerfragmente erzeugt, die sich zu SUV zusammenlagern. In Übereinstimmung mit der Theorie (38) wurde experimentell gefunden, daß der Radius der SUV und damit der Radius von Phospholipidvesikeln überhaupt 10 nm nicht unterschreiten kann (41).

Durch ein anderes Präparationsprinzip (25) werden solche Vesikel hergestellt, die große Radien aufweisen (42) (siehe Kap. 4.1.1.) und nach der Präparationsmethode REV genannt werden (siehe Kap. 2.5.1.). Bei diesem Verfahren wird Lipid in organischem Lösungsmittel gelöst (Abb. 5a) und anschließend wässriges Medium hinzugegeben (Abb. 5b). Die folgende Ultrabeschallung dient zur Bildung reverser Micellen, kleiner Wassertröpfchen, die durch einen Lipidmonolayer stabilisiert und gegen die organische Phase abgegrenzt werden (Abb. 5c). Durch Entfernen des organischen Lösungsmittels nähern sich die reversen Micellen einander (Abb. 5d), bis einige durch Zerfall und Fusion (Abb. 5e) den äußeren Monolayer und das umgebende wässrige Medium für die übrigen zur Verfügung stellen. Die Vesikelbildung ist abgeschlossen (Abb. 5f) (25). Die Vesikel sind, abhängig von ihrer Zusammensetzung, über mehr als ein halbes Jahr stabil (43).

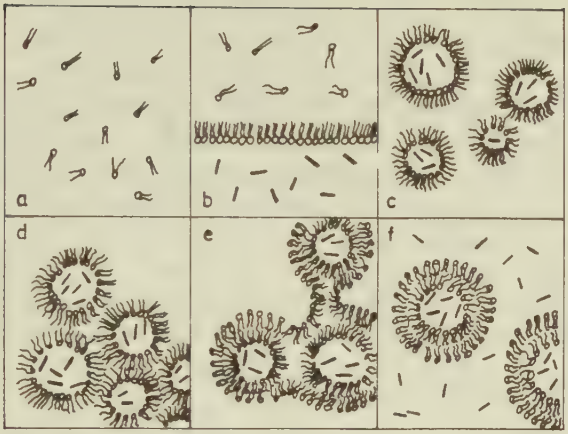

Abb. 5 ,nach (25) Bildung von REV. Die Darstellungen sind nicht maßstabsgerecht. Erläuterungen siehe Text.
Lipidmolekül
Wässriges Medium mit Nukleinsäure

3.1.3. Struktur der Phospholipide im Bilayer und ihre intermolekularen Wechselwirkungen

Grundbausteine der Phosphoglyceridlipide ist das Glycerolphosphat, das ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besitzt und dementsprechend nach der sn - Nomenklatur beschrieben werden soll. Wie in Abb. 6 dargestellt, ergibt sich die Bezeichnung: L - Glycero - 3 - Phosphat.

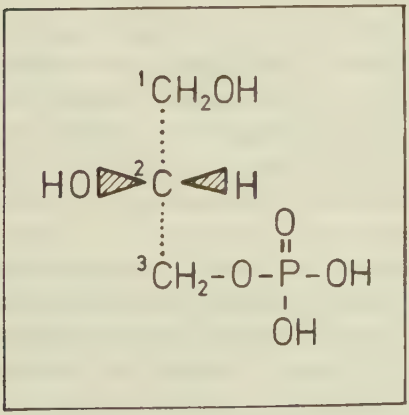

Abb. 6 L - Glycero - 3 - Phosphat nach der stereospezifischen Nummerierung (sn).

Die Hydroxylgruppen der Kohlenstoffatome 1 und 2 werden mit Fettsäuren verestert, die γ - bzw. β - Kette genannt werden. Kohlenstoffatom 3 trägt die polare Kopfgruppe, die nach Veresterung des Phosphates mit einem Alkohol als α - Kette bezeichnet wird. Als Beispiel ist die Struktur von Phosphatidylcholin, wie sie sich aus Röntgenstrukturanalyse (39) und NMR - Daten (44) ergibt, sowie die Bezeichnung der Winkel und Atome in Abb. 7 dargestellt.

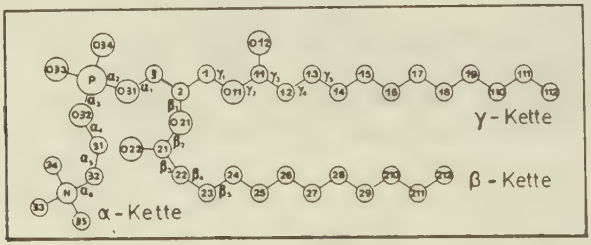

Abb. 7 Die Struktur von Phosphatidylcholin mit der Bezeichnung der Atome und Bindungswinkel, nach (39).

Die Bindungswinkel der α - Kette werden mit α_i bezeichnet, dementsprechend die Winkel der β - und γ - Ketten mit β_i und γ_i.

Wesentlich sind vier Charakteristika der Struktur (39,44):

1) Das Glycerolrückgrat und die γ - Kette liegen in einer all - trans - Konformation vor und bilden somit ein durchlaufendes Zick - Zack - Muster senkrecht zur Membranebene.
2) Die β - Kette beginnt parallel zur Membran und knickt erst auf der Position der ersten CH_2 - Gruppe (C22) soweit ab, daß der Rest der Kette senkrecht zur Membran und parallel zur γ - Kette verläuft.
3) Da die Phosphodiesterbindung zwei gauche - Konformationen aufweist, knickt die α - Kette senkrecht zum Glycerolrückgrat ab und liegt parallel zur Membranebene. Die Konformationen sind: α_1: trans, α_2 und α_3: gauche, α_4: variabel (meist nahe trans), α_5: gauche.
4) Die Bindung zwischen C2 und C3 des Glycerols hat keine be-

vorzugte Konformation, sondern kann beliebige Werte annehmen und ist im hydratisierten Bilayer wahrscheinlich eine Achse freier Rotation (39,45).

Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Struktur von Phosphatidylcholin unabhängig ist vom Aggregatzustand und dem Hydratisierungsgrad und im Kristall die gleiche ist wie im Bilayer eines Vesikels (45).

Im Gegensatz zu Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin, die eine negative Nettoladung tragen, ist Phosphatidylcholin ein Zwitterion mit einem starken Dipolmoment. Der Schwerpunkt der negativen Ladungen liegt zwischen den nicht veresterten Sauerstoffatomen oberhalb des Phosphors, die positive Ladung liegt in der voluminösen Trimethylammoniumgruppe (46) (siehe Abb. 9). Durch zwei fest gebundene H_2O - Moleküle an der Phosphatgruppe wird ein Teil der negativen Ladung nach außen abgeschirmt (39). In Übereinstimmung mit der Konformation und den elektrischen Eigenschaften des Phosphatidylcholins wurde mit verschiedenen Methoden eine deutliche intermolekulare Wechselwirkung gemessen (39, 47 - 50). Die Stärke dieser Wechselwirkung hängt ab vom Abstand der Dipole voneinander und der Dielektrizitätskonstanten des Bereiches zwischen den Dipolen, also der Hydratisierung. In Bilayern aus Phosphatidylcholin mit vollständig gesättigten Fettsäuren, wie DPPC, ist der Abstand der Dipole minimal und wird durch die Ausdehnung der Kopfgruppe selbst bestimmt (39, 51, vgl. Kap. 3.1.5.). Durch Einführung von Doppelbindungen in die Fettsäuren wird der Querschnitt der Fettsäuren im Kohlenwasserstoffbereich jedoch größer als der Platzbedarf der Cholinkopfgruppe. Durch Messung der Asymmetrie der Lipidverteilung in stark gekrümmten Bilayern (52) , des Volumens der Kopfgruppen in Monolayern mittels Schub - Fläche - Korrelation (53) und Ladungsdichtemessung auf dem Bilayer (54) wurde übereinstimmend nachgewiesen, daß die Cholinkopfgruppen und damit die Dipole in DOPC - Membranen weiter voneinander entfernt sind als in DPPC - Membranen.

Von besonderer Bedeutung ist möglicherweise die in Punkt 4 (Seite 20f) beschriebene freie Rotation um die C2 - C3 - Achse im Glycerol (39,45). Aufgrund der Konformation der Phosphodiesterbindung würde eine solche Rotation dazu führen, daß sich

die Kopfgruppe aus der Membran herausbewegt. Wie in Abb. 8 dargestellt, rotierte die Kopfgruppe auf einem Kegelmantel um eine Achse, die um 65° gegen die Membranebene geneigt wäre. Ein solches Ausweichen aus der Membranebene würde die intermolekulare Dipol - Dipol - Wechselwirkung unterbrechen und ist daher energetisch ungünstig. Die Kopfgruppe wird trotz der Rotation in der Membranebene fixiert, da die Dipol - Dipol - Wechselwirkung synchron zur Rotation um die C2 - C3 - Achse eine Inversion von α_5 oder aller Winkel von α_2 bis α_5 erzwingt (39). Auf diese Weise bleibt das Dipolmoment zu jedem Zeitpunkt in der Membranebene. Die Konformationen sind in Abb. 8 zusammengefaßt.

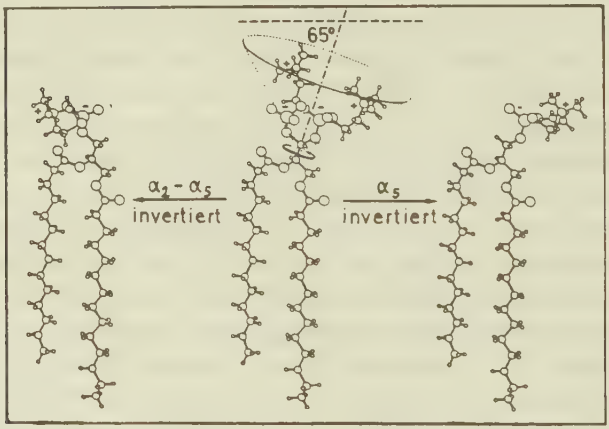

Abb. 8 Einfluß der Rotation um die C2 - C3 - Achse des Glycerols auf die Orientierung der Phosphatidylcholinkopfgruppe. Erläuterungen siehe Text. (aus (39))

Dieser Mechanismus impliziert aber, daß beim Wegfallen der elektrostatischen Attraktion im Bilayer (siehe unten) eine partielle Aufrichtung der Kopfgruppen spontan erfolgen kann, ohne Energie zu verbrauchen. Umgekehrt kann man sich auch leicht verdeutlichen, daß eine permanente Aufrichtung der Kopfgruppe ebenfalls durch Inversion der Winkel α_2 bis α_5

bei der Rotation um die C2 - C3 - Achse möglich ist, etwa dann, wenn eine elektrostatische Attraktion senkrecht zur Membran energetisch noch günstiger ist als die Dipol - Dipol - Wechselwirkung in der Membran.

In der Tat konnten durch elektrostatische und sterische Kräfte Konformationsänderungen in der Kopfgruppe induziert werden. 1981 berichtete Seelig von Konformationsänderungen an den Winkeln α_4 und α_5 bei der Beladung von PC - Membranen mit dreiwertigen Lanthanidionen in hohen Konzentrationen (55) und 1982 gelangen Brouillette et al. der Nachweis, daß unter extremen Packungsbedingungen die Kopfgruppen aus der Membran herausgedrückt und partiell aufgerichtet werden können (56). Von Konformationsänderungen oder der Aufrichtung der Kopfgruppe unter dem Einfluß von Anionen wurde bisher nicht berichtet.

Die Struktur der negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin ist weitaus weniger gut bekannt als die Struktur von Phosphatidylcholin (Abb.9).

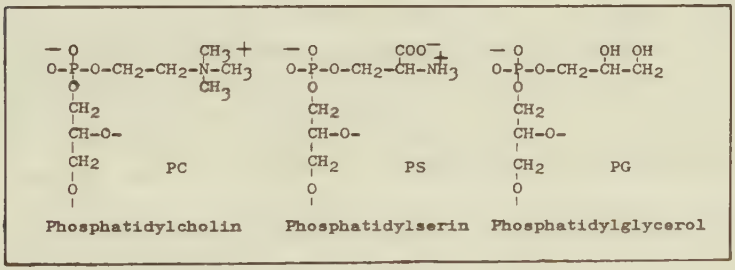

Abb. 9 Die Kopfgruppen von Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol.

Als gesichert gilt, daß die Kopfgruppen wie bei Phosphatidylcholin parallel zur Membran liegen (50,57) und auch die Konformation des Glycerolrückgrates gegenüber Phosphatidylcholin nicht verändert ist (44). Ebenfalls sicher ist, daß für Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin Wasserstoffbrückenbindungen und für Phosphatidylserin Ionenbindungen eine große Bedeutung besitzen (50, 57). Die genauen Konfor-

mationen der Kopfgruppen sind jedoch noch unbekannt und große Unsicherheit herrscht auch in den wesentlichen Fragen nach dem Platzbedarf und der Beweglichkeit der Kopfgruppen (50, 57 - 61).

Kürzlich wurden von Sixl und Watts der Einfluß von Phosphatidylglycerol (58,59) und Phosphatidylserin (59) auf Phosphatidylcholin gemessen. Es zeigte sich, daß bereits bei kleinen Konzentrationen die negativ geladenen Phosphoglyceride die Struktur der Phosphatidylcholinkopfgruppen weitaus stärker stören als bisher untersuchte strukturfremde Substanzen, die sich in die Membran einlagern lassen. Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin führen zu einer Vergrößerung der Bewegungsamplitude bei der Rotation der Phosphatidylcholinkopfgruppe in der Membran, die noch eine Konformationsänderung einschließen kann. Dies heißt, daß die elektrostatische Dipol - Dipol - Wechselwirkung zwischen den Phosphatidylcholinmolekülen unterbrochen wird, ohne daß eine äquivalente elektrostatische Attraktion der Phosphatidylcholindipole durch die negativ geladenen Phosphatidylglycerol- und Phosphatidylserinmonopole an ihre Stelle tritt (59). Dementsprechend gehen Sixl und Watts davon aus, daß die Störung der Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinkopfgruppen nicht durch die elektrischen, sondern spezifische sterische Eigenschaften der Phosphatidylglycerol- und Phosphatidylserinmoleküle hervorgerufen wird (58).

3.1.4. Elektrische Eigenschaften von Phospholipidbilayern

Die pK - Werte der ionisierbaren Gruppen der für diese Arbeit verwendeten Lipide sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Lipid	Ionisierbare Gruppe	pK - Wert	Literaturzitat
PS	-COOH	4,4	(62)
PS	$-NH_3^+$	11,5	(62)
PS,PG,PC	$(RO)_2PO(OH)$	2,5	(63)

Tab. 1 pK - Werte der ionisierbaren Gruppen der Phospholipide

Obwohl die pK - Werte der Phospholipide in der Membran etwas anders sind als im isolierten Molekül, liegen bei Ionenstärken über 0,1 mM NaCl im neutralen pH - Bereich alle aufgeführten Gruppen im ionisierten Zustand vor (63). Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol tragen eine negative Ladung, Phosphatidylcholin liegt als Zwitterion vor. Cardiolipin, das ebenfalls bei einem Versuch verwendet wurde, trägt zwei negative Ladungen pro Molekül.

Die Potentiale der somit elektrisch geladenen Phospholipidmembranen werden durch einwertige Ionen gegen das umgebende wässrige Milieu abgeschirmt. So fällt das elektrische Potential ψ mit der Entfernung r ab nach $\psi = \psi_o \exp[-\varkappa r]$ (64,65). Dabei gilt für die Abschirmkonstante $\varkappa \sim \sqrt{c}$; c ist die Ionenstärke des Mediums. Für 100 mM NaCl ist $1/\varkappa$ = 1 nm, für 10 mM NaCl bereits 3,2 nm (64), so daß die Potentiale mit abnehmender Ionenstärke immer weitreichender werden.

Die elektrischen Eigenschaften von Phosphatidylglycerolmembranen unterscheiden sich wahrscheinlich nicht von denen der Phosphatidylserinmembranen (66). Die erste Gegenionenschicht (Stern - Layer) liegt etwa 0,3 nm über der Fläche, die durch die Kopfgruppen gebildet wird (60). Obwohl Phosphatidylcholin als Zwitterion vorliegt, erzeugt es insgesamt positive Potentiale, da die negativen Potentiale des Phosphates abgeschwächt werden (39). So wurden an EPC - Monolayern bei neutralem pH positive Gesamtpotentiale gemessen (67). Für die Form des Potentialabfalles im wässrigen Medium gilt das gleiche wie oben für Phosphatidylserinmembranen gesagte (54). Phosphatidylcholinmembranen sind etwa zwei H_2O - Lagen (1 nm) hoch mit quasikristallinem Wasser bedeckt (68).

3.1.5. Phasenübergänge von Phospholipiden

Phospholipide können in zwei grundsätzlich verschiedenen Zuständen existieren. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_c sind die Fettsäureketten in einem quasikristallinen, hexagonalen Kristallgitter gepackt und zeigen eine durchgängige all - trans - Konformation (64), die Kopfgruppen liegen in einer fixierten Orientierung vor (46,39) und eine laterale Diffusion ist nur im Bereich von Fehlstellen im Kristallgitter

möglich (64). Bei Temperaturen oberhalb T_c existiert keine hexagonale Packung mehr und die Lipide können im Bilayer eingeschränkt wie in einer zweidimensionalen Flüssigkeit diffundieren (51). Außerdem enthält jede Fettsäurekette vier bis fünf gauche - Konformationen, die jedoch nicht fixiert sind, sondern die Kette insgesamt flexibler machen, ohne daß Bewegungen der gesamten Kette auftreten (44). Die Kopfgruppen können in beschränktem Maße in der Membranebene rotieren (51). Während des Phasenüberganges, der ein Übergang zwischen zwei flüssigkristallinen Zuständen ist, existieren innerhalb eines Bilayers viele kleine Domänen von ca. 100 Lipidmolekülen in festem bzw. flüssigem Zustand nebeneinander, so daß die Gibbs'sche Energie G nicht nur von Temperatur und Druck, sondern auch von Spannung und Kompressibilität an den Rändern der Domänen abhängt. Da letztere Parameter mit der Größe der Domäne variieren, folgt daraus, daß der Phasenübergang nicht, wie bei einem Übergang erster Ordnung zu erwarten, bei einer festen Temperatur, sondern innerhalb eines Temperaturintervalles von ca. 1°C stattfindet (64). Die Übergangstemperatur T_c verändert sich mit dem pH - Wert im pK - Bereich der dissoziierbaren Gruppen (69), während geringe Abhängigkeiten von der Konzentration einwertiger Ionen erst bei Konzentrationen über 800 mM beobachtet wurden (62). In Abwesenheit zweiwertiger Ionen sind die T_c - Werte für ein definiertes Phospholipid im pH - Bereich zwischen 4 und 10 und NaCl - Konzentrationen zwischen 0,1 und 800 mM konstant (62,64,69).

Phospholipide, deren Fettsäurereste im festen Zustand eine geringere Querschnittsfläche beanspruchen als die Kopfgruppen, zeigen ein besonderes Verhalten. Beispiele sind alle Phosphatidylcholine mit zwei gesättigten Fettsäuren, wie DPPC. Damit trotz des durch die große Kopfgruppe vorgegebenen Abstandes zwischen den Fettsäuren eine optimale van der Waals - Wechselwirkung der CH_2 - Gruppen ermöglicht wird, neigen sich die Fettsäuren relativ zur Bilayernormalen um einen Winkel von 36° (39). Systeme dieser Art zeigen bei einer bestimmten Temperatur unterhalb des oben charakterisierten Phasenüberganges einen sogenannten Vorübergang, bei welchem die Lipide ihre Konformation ändern. Charakteristisch für diese Inter-

mediärphase ist eine makroskopische Wellung des Bilayers (51). Beide Übergänge sind erster Ordnung (51). Das System ist in Abb. 10 dargestellt. Zur Messung der Phasenübergänge siehe Kap. 3.1.7. und Abb. 16 aus Kap. 4.1.6. .

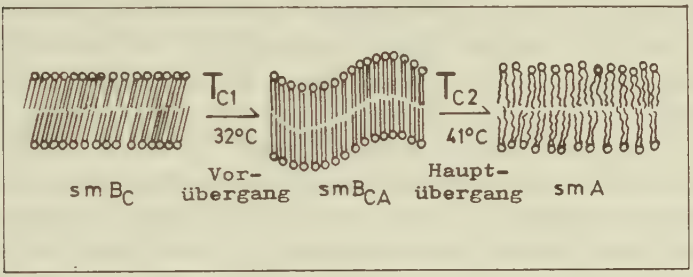

Abb. 10 Phasenübergänge des DPPC bei mehr als 30% H_2O (71). Angegeben ist die Bezeichnung der Phasen nach der Theorie der Flüssigkristalle (51).

In Tab. 2 sind die Phasenübergangstemperaturen der für diese Arbeit verwendeten Phospholipide zusammengestellt. Die Zahlenwerte wurden dem Übersichtsartikel von Papahadjopoulos (43) entnommen.

Lipid	T_c / °C
EPC	-15 bis -7
PS (Rinderhirn)	+6 bis +8
DOPC	-22
DPPC:	
Vorübergang	+32
Hauptübergang	+41

Tab. 2 Phasenübergangstemperaturen von Phospholipiden nach (43).

Nach (72) und (73) unterscheiden sich die T_c - Werte von Phosphatidylglycerol nicht von den T_c - Werten von Phospatidylcholin, wenn die Fettsäuren die gleichen sind. Da Phosphatidylglycerol von der Firma Calbiochem aus EPC hergestellt wird und damit die gleichen Fettsäuren aufweist, heißt dies, daß alle für diese Arbeit verwendeten Lipide außer DPPC bei Zimmertemperatur in flüssiger Form vorliegen.

3.1.6. Mischbarkeit von Lipiden und laterale Phasentrennung

Die Mischbarkeit zweier Phospholipide im Bilayer hängt ab vom Aggregatzustand der Lipide (74), der Fettsäurezusammensetzung (74), den Kopfgruppen (75) sowie dem Ionenmilieu des wässrigen Mediums (76). Übereinstimmend wurde berichtet, daß Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin mit gleichen Fettsäuren (70), speziell Phosphatidylcholin aus Eigelb und Phosphatidylserin aus Rinderhirn (76), in Abwesenheit zweiwertiger Ionen über sämtliche Konzentrationsbereiche mischbar sind, ohne daß Domänen entstehen, in welchen eines der beiden Phospholipide angereichert ist. Lediglich in Anwesenheit von Ca^{++} (ab 1 mM) wurde eine laterale Phasentrennung in eine feste Phosphatidylserinphase und eine flüssige Phosphatidylcholinphase beobachtet (76,77).

Erst 1982 ergaben sich Indizien dafür, daß EPC und Phosphatidylglycerol nicht über alle Konzentrationsbereiche mischbar sind. Zwischen 50% und 90% Phosphatidylglycerol bilden sich Bereiche, in denen Phosphatidylglycerol zu 90% angereichert ist. Unterhalb 50% Phosphatidylglycerol sind die beiden Lipide jedoch vollständig mischbar (73).

Eine besondere Bedeutung besitzen die Mischungen von Cholesterol mit Phosphatidylcholin. Cholesterol kann bis zu einem Verhältnis von 1:1 mit Phospholipiden in einer Membran gemischt werden (78). Hierbei bindet Cholesterol durch van der Waals - Wechselwirkung an den Kohlenwasserstoffbereich der Phospholipide, deren Fettsäureketten hierdurch im Bereich der vier Ringe des Cholesterols immobilisiert werden (78). Über eine Wasserstoffbrückenbindung an das Sauerstoffatom O22 (vgl. Abb. 7, Kap. 3.1.3) der Esterbindung zwischen Glycerol und β - Kette (79) wird die Position des Cholesterols im Bilayer fixiert. Das Phasendiagramm des Cholesterol - Phosphatidylcholin - Systems ist recht komplex (vgl. hierzu 79). Bei 50% Cholesterol liegt ein kristallines Gitter eines 1:1 - Komplexes vor. Während der Einfluß des Cholesterols auf den Kohlenwasserstoffbereich weitgehend geklärt ist (78, 80), herrscht über den Einfluß auf die Kopfgruppen der Phospholipide noch Uneinigkeit. Sicher ist, daß durch die Komplexbildung die Querschnittsfläche des Kohlenwasserstoffbereiches

pro Komplex gegenüber dem Platzbedarf der Phosphatidylcholinkopfgruppe zunimmt (79). Andererseits konnte offensichtlich noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, ob diese Änderungen groß genug sind, um einen Einfluß auf die Kopfgruppen und deren intermolekulare Wechselwirkung auszuüben (47 - 49, 78).

3.1.7. Optische Eigenschaften der Vesikellösungen

Die Trübung τ einer Probe ist definiert in Analogie zur Extinktion nach $\ln(I_o/I) = \tau l$. I_o und I sind die Intensitäten des Lichtstrahles vor dem Eintritt in die Probe und nach dem Verlassen der Probe, l ist die optische Weglänge. Man kann zeigen (81), daß die Trübung vom Brechungsinkrement der Lösung dn/dc_L abhängt; n ist der Brechungsindex, c_L die Lipidkonzentration. Ändert sich die Trübung einer Lösung mit der Temperatur, so ist dies wesentlich auf die Änderung des Brechungsinkrementes durch Temperaturänderung zurückzuführen. Yi und MacDonald (81) zeigten, daß dn/dc_L mit steigender Temperatur kleiner wird und dementsprechend die Trübung abnimmt. Abb. 18a aus Kap. 4.2.1. zeigt diesen Effekt an einer Messung an EPC - REV ohne Nukleinsäureeinschluß, wie sie durchgeführt wurde, um das Trübungsverhältnis bei den Wellenlängen 260 nm und 320 nm zu bestimmen. dn/dc_L ändert sich sprunghaft im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur der Lipide (81). Zu den Änderungen tragen zwei Effekte zu gleichen Anteilen bei. Zum einen ändert sich dn/dc_L mit der Temperatur durch die Änderung der Dichte der Lipidphase (speziell beim Phasenübergang ändert sich das Molvolumen um 1,4%), zum anderen ändert sich bei konstanter Polarisierbarkeit die Anisotropie, da der Unterschied zwischen der Polarisierbarkeit senkrecht und parallel zu den Kohlenwasserstoffketten geringer wird durch die zunehmende Kettenbeweglichkeit bei steigender Temperatur, speziell mit einer sprunghaften Änderung beim Phasenübergang. Eine solche Anisotropieverringerung führt ebenfalls zu einer Verringerung der Trübung (81). Yi und MacDonald konnten durch Meßung der Trübung τ in Abhängigkeit von der Temperatur auch den Vorübergang von DPPC messen. Siehe hierzu Abb. 16 aus Kap. 4.1.6.

3.2. Nukleinsäuren

3.2.1. Der Helix - Knäuel - Übergang

Der Helix - Knäuel - Übergang der Nukleinsäure ist der Übergang von der doppelhelikalen Struktur in zwei ungeordnete Einzelstränge. Zur Helixstabilität tragen sowohl die Wasserstoffbrücken der Basenpaare als auch die Stapelwechselwirkung der planar aufeinanderliegenden aromatischen Basen bei.

Die Bildung eines Basenpaares in Nachbarschaft zu einem bereits bestehenden Basenpaar ist sowohl infolge der lokal hohen Konzentration der Basen als auch infolge der Stapelwechselwirkung, die zur Helixstabilität den größten Beitrag liefert (82), energetisch stark begünstigt gegenüber der Bildung eines isolierten Basenpaares. Detaillierte Messungen haben gezeigt, daß die ersten zwei bis drei Basenpaare ein schnelles Vorgleichgewicht bilden (Nukleation) und danach die Doppelstrangbildung hochkooperativ verläuft (83). Die mittlere Anzahl von Basenpaaren, die sich nach einer Nukleation bilden, wird als kooperative Länge bezeichnet; sie wird in der Literatur unterschiedlich angegeben und liegt im allgemeinen zwischen 100 und 300 Basenpaaren (84,85). Die Temperatur, bei der die Doppelstrangbildung bzw. -trennung zur Hälfte abgelaufen ist, wird mit T_m bezeichnet. Für einen voll kooperativen Prozess, d.h. wenn nur der total basengepaarte oder der total dissoziierte Zustand existieren, kann als Reaktionsgleichung geschrieben werden

$$H \rightleftharpoons S_1 + S_2 \qquad \text{Gl. 1}$$

wobei H, S_1 und S_2 die Helix und die beiden Einzelstränge bezeichnen. Da die Konzentration der beiden Doppelstränge stets gleich ist ($c_{S1} = c_{S2} := c_S$), wird der Umwandlungsgrad Θ definiert zu

$$\Theta = \frac{c_S}{c_S + 2c_H} \qquad \text{Gl. 2}$$

(nach 83). Ein experimentelles Denaturierungsprofil und die erste Ableitung sind in Abb. 11 dargestellt.

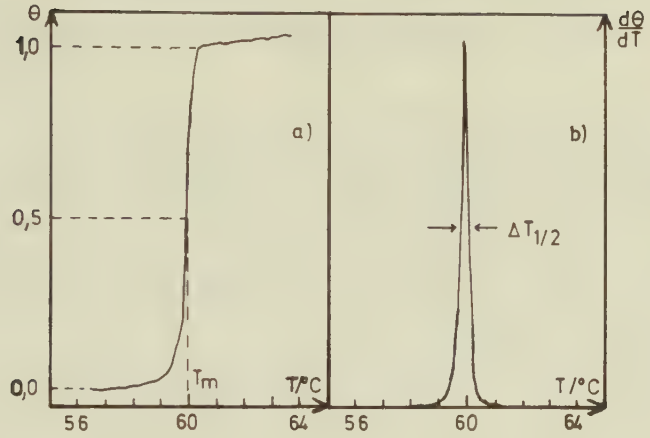

Abb. 11 Denaturierungsprofil eines definierten Nukleinsäurestückes am Beispiel einer 187 bp DNA (vgl. Kap. 3.2.3.) bei 10 mM NaCl in Standardpuffer.
a) Bestimmung des T_m - Wertes aus der Auftragung Θ vs T.
b) Bestimmung der Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ aus der ersten Ableitung dΘ/dT vs T.

Die Annahme, daß die Nukleinsäure entweder nur in ihrer doppelsträngigen oder nur in ihrer einzelsträngigen Form vorliegt (Alles - oder - Nichts - Modell), ist nicht völlig korrekt. Dennoch ist dieses Modell eine gute Näherung bei der Beschreibung der thermischen Denaturierung von Nukleinsäuren, solange die Anzahl der Nukleotide unter der kooperativen Länge bleibt. Die Gleichgewichtskonstante K des Prozesses von Gl. 1 läßt sich schreiben als

$$K = c_{S1} c_{S2} / c_H = \Theta \; c_H^o / (1-\Theta) \; ,$$

wobei c_H^o die Einwaagekonzentration der Nukleinsäure ist. Mit der van't Hoff - Gleichung ergibt sich die apparente oder van't Hoff'sche Enthalpie ΔH_v der Reaktion zu

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = - \frac{\Delta Hv}{R} \qquad \text{Gl. 3}$$

Mit der Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ folgt nach (83)

$$\Delta H_v = \frac{6\ RT_m^2}{\Delta T_{1/2}} \qquad \text{Gl. 4}$$

Für den Alles - oder - Nichts-Prozess ist die van't Hoff'sche Enthalpie ΔH_v mit der gesamten Enthalpie des Prozesses ΔH_g identisch. Außerdem muß die Denaturierungsreaktion reversibel sein, da die Gleichungen der klassischen Thermodynamik natürlich nicht auf irreversible Prozesse angewendet werden können. Reversibel ist die Reaktion nur oberhalb einer bestimmten Grenzionenstärke (vgl. Kap. 3.2.2.).

Berücksichtigt man die Tatsache, daß für das erste Basenpaar keine Stapelwechselwirkung existiert, so gilt für die gesamte Enthalpie der Denaturierung ΔH_g einer Nukleinsäure mit n Basenpaaren

$$\Delta H_g = (n-1)\cdot\Delta H_{bp} \qquad \text{Gl. 5}$$

wobei ΔH_{bp} die Enthalpie für die Bildung eines Basenpaares beim Helixwachstum ist (83). Ist die Nukleinsäure so lang, daß mehrere Bereiche der Helix überlagert, aber teilweise unabhängig voneinander denaturieren, so ist die einfache Gl. 5 nicht mehr zu benutzen (86).

Die für die Experimente zu dieser Arbeit verwendeten DNA - Stücke denaturieren in einem einzigen Übergang hochkooperativ. Aufgrund ihrer Länge von 179 bp und 187 bp bedeutet dies nach Gl. 4 und Gl. 5, daß die Halbwertsbreiten entsprechend gering sind.

Die Denaturierung der Nukleinsäure läßt sich durch Messung der optischen Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgen. Die UV - Absorption ist in der Helix infolge der Stapelwechselwirkung bis zu 40% geringer als in den Einzelsträngen (Hypochromie). Die Absorptionszunahme bei 260 nm bei steigender Temperatur ist proportional dem Verhältnis von ungestapelten zu gestapelten Basen und damit ein direktes Maß für den Grad der Denaturierung. Der T_m - Wert ergibt sich somit als die Temperatur, bei welcher die Absorptionszunahme die Hälfte des maximalen Wertes erreicht hat (87).

3.2.2. Elektrostatische Eigenschaften der Nukleinsäure und die Abhängigkeit des Helix - Knäuel - Überganges von der Ionenstärke

Bei pH - Werten über 3 liegen die Phosphate der Nukleinsäuren im ionisierten Zustand vor und tragen eine negative Ladung (88). Die Abschirmung der Ladungen durch Gegenionen verringert die Reichweiten der elektrostatischen Kräft erheblich.

Nach Manning (91) und Record et al. (92) erfolgt die Abschirmung auf zwei verschiedene Weisen. Es existiert sowohl eine Schicht kondensierter Gegenionen unmittelbar auf der Oberfläche des geladenen Körpers als auch eine weiter ausgedehnte Gegenionenwolke, die die Restladungen abschirmt und nach der Debye - Hückel - Theorie beschrieben werden kann. Die Schichtdicke der kondensierten Gegenionen liegt ungefähr bei 1 nm (91). Die Konzentration der Gegenionen in dieser Schicht, und damit der Anteil abgeschirmter Ladungen, ist nicht von der Ionenkonzentration des wässrigen Mediums abhängig, sondern für den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 200 mM nahezu konstant (91). Durch diese erste Gegenionenschicht verbleibt von jedem Phosphat doppelsträngiger DNA nur noch 25% der negativen Ladung, von jedem Phosphat einzelsträngiger DNA noch 60%. Aufgrund der unterschiedlichen Ladungsabschirmung erhöht sich die Zahl der Ladungen beim Übergang von doppelsträngiger DNA in einzelsträngige um den Faktor 2,5. Da sich beim Helix - Knäuel - Übergang aber auch der Abstand zweier Phosphatgruppen von 0,17 nm auf 0,4 nm erhöht, sinkt die Ladungsdichte insgesamt ab (91). (Der Wert von 0,17 nm kommt dadurch zustande, daß der Abstand von vier Phosphatgruppen zweier Basenpaare 0,34 nm beträgt, der Abstand zweier Phosphatgruppen demnach die Hälfte.) Die unterschiedliche Abschirmung von einzel- und doppelsträngiger DNA ist bei GC - reichen Stücken weniger stark ausgeprägt als bei AT - reichen (93).

Die verbliebenen restlichen Ladungen werden durch eine diffuse Gegenionenwolke auf 12% (Doppelstränge) bzw. 30% (Einzelstränge) der Ladungen reduziert (92). Zur Abschirm-

konstanten $\varkappa$ vgl. Kap. 3.1.4. Die Potentialreichweiten fallen mit steigender Ionenstärke, wobei die Werte für doppelsträngige und einzelsträngige DNA nahezu identisch sind (90,92). Die angegebenen Zahlenwerte gelten ungefähr auch für RNA (91).

Aufgrund der unterschiedlichen Kondensation von Gegenionen auf doppelsträngige und einzelsträngige Nukleinsäure muß Gl. 1 aus Kap. 3.2.1. modifiziert werden zu

$$H \rightleftharpoons S_1 + S_2 + \Delta n \cdot Na^+ \qquad \text{Gl. 6}$$

H, S_1, S_2 seien die Helix und die beiden Einzelstränge und Δn die stöchiometrische Menge an freigesetzten Natriumionen. Mit dieser Gleichung folgt bereits aus dem Massenwirkungsgesetz, daß die Übergangstemperatur mit steigender Ionenstärke ansteigen muß. Eine genauere Rechnung muß noch die Tatsache berücksichtigen, daß die Doppelstränge durch die diffuse Gegenionenwolke weniger stark abgeschirmt werden als die Einzelstränge, da sie insgesamt infolge der stärkeren Abschirmung durch kondensierte Gegenionen eine geringere Zahl von Ladungen tragen. Hieraus verringert sich der Effekt der Ionenstärke, wie er sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergäbe, um die Hälfte. Insgesamt ist der T_m - Wert logarithmisch von der Ionenkonzentration abhängig (92).

Um eine vollständige Abhängigkeit des T_m - Wertes von den Parametern des Experimentes anzugeben, muß neben der Ionenstärkeabhängigkeit noch die Abhängigkeit vom GC - Gehalt der DNA berücksichtigt werden. GC - reiche Regionen denaturieren bei höheren Temperaturen als AT - reiche (88). Bereits 1962 fanden Marmur und Doty eine lineare Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur vom GC - Gehalt x_{GC} der Nukleinsäure (94). Damit gilt insgesamt (88) :

$$T_m = a_1 + a_2 \cdot x_{GC} + a_3 \cdot \lg c_{Na^+} \qquad \text{Gl. 7}$$

wobei a_1, a_2, a_3 konstante Größen sind.

Unterhalb einer bestimmten, für jede DNA charakteristischen Ionenstärke ändert sich der Mechanismus der Denaturierung, da bei geringer Ionenstärke der Zufluß der zusätzlichen Natriumionen beliebig unwahrscheinlich wird. Die Denaturierung wird irreversibel (93).

Der Einfluß der Ionenstärke auf die Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$

war an größeren DNA - Stücken, die in mehreren Übergängen denaturieren, nicht genau feststellbar (95). 1981 zeigten Hillen et al. durch thermische Denaturierung kleiner, definierter DNA - Fragmente mit nur einem Übergang, daß eine definierte Abhängigkeit des $\Delta T_{1/2}$ - Wertes von der Ionenstärke existiert (84). Innerhalb eines Konzentrationsbereiches von ca. 40 mM NaCl, dessen Lage für jede DNA charakteristisch ist, erfolgt ein sigmoider Anstieg von $\Delta T_{1/2}$ um ca. 70%. Bei geringeren und höheren Ionenstärken bleibt $\Delta T_{1/2}$ konstant(84).

3.2.3. Charakterisierung der verwendeten Nukleinsäuren

Transposon Tn10, für die Tetrazyklinresistenz verantwortlich, trägt auf einem 187 bp langen Stück die Operatorsequenz zum Strukturgen eines Proteins, das als Carrier Tetrazyklin aktiv aus der Zelle hinaustransportiert (96). Dieses 187 bp DNA - Stück wurde von Hillen et al. als Hexamer in pWH106 kloniert (Eco R1 - Schnittstelle) (96). Das 179 bp DNA - Stück entsteht nach Hae III - Spaltung von pVH51 und kann mit einer eigenen biologischen Funktion nicht verbunden werden (97). Die Daten der verwendeten Nukleinsäuren sind in Tab. 3 zusammengestellt.

	DNA		poly A·poly U
Zahl der Basenpaare (bp)	179	187	~ 400
Länge in nm	61	63	~ 140
Molgewicht in kg/mol	118	123	~ 265
Isoliert aus Plasmid	pVH51	pWH106	---
GC - Gehalt nach Sequenz (98)	56%	38%	---

Tab. 3 Daten der verwendeten Nukleinsäuren

4. Experimentelle Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Vesikel

4.1.1. Größenverteilung

Nach (25) und (42) sind die mittleren Radien der REV abhängig von der Lipidzusammensetzung des Vesikels. Für Vesikel aus Phosphatidylglycerol und Phosphatidylglycerol - Phosphatidylcholin - Mischungen waren Radien von 80 nm bis 100 nm aus der Literatur bekannt (25,42), nicht aber für Vesikel aus EPC. Überdies mußte überprüft werden, ob sich die Größenverteilung durch den Einschluß von Nukleinsäure verändert. Daher wurden nach Kap. 2.5. EPC - REV hergestellt, die Puffer oder poly A·poly U - Lösung enthielten. Anschließend wurden nach Kap. 2.8. elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Abb. 1 aus Kap. 1.1. zeigt als Beispiel eine EM - Aufnahme von EPC - Vesikeln ohne Nukleinsäureeinschluß. Die Durchmesser der Vesikel wurden vermessen und bestimmten Größenintervallen zugeordnet. Abb. 12 zeigt beide Größenverteilungen.

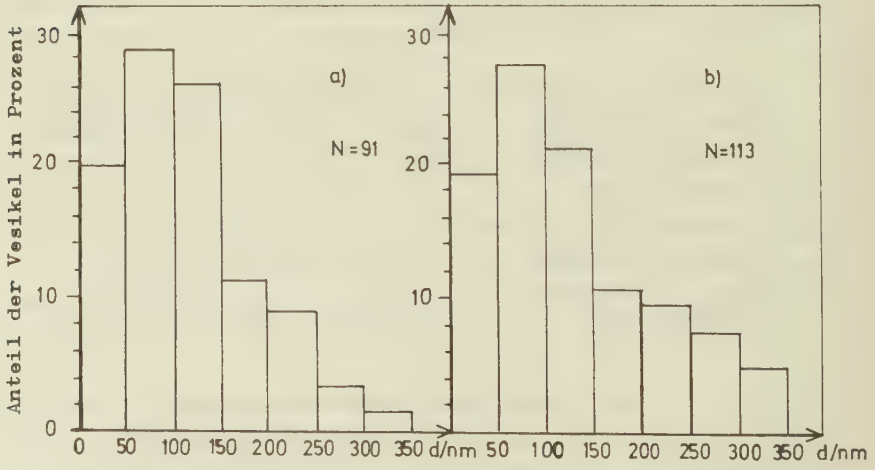

Abb. 12 Die Größenverteilungen der EPC - REV a) ohne und b) mit eingeschlossener Nukleinsäure, bestimmt aus EM - Aufnahmen (als Beispiel siehe Abb. 1). Die Ordinate bezeichnet den relativen Anteil von Vesikeln an den Größenintervallen in Prozent.
N = Gesamtzahl der Vesikel

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, erfolgt durch den Einschluß von Nukleinsäure keine wesentliche Änderung der Größenverteilung. Eine Mittelung über das Volumen r^3 ergibt einen mittleren Radius von ungefähr 90 nm. Dieser Wert für EPC - REV entspricht dem oben angegebenen Radius von PG und PG - PC - Vesikeln. Dies bestätigt, daß die Radien von Phospholipidvesikeln verschiedener Zusammensetzung ähnlich sind; starke Änderungen treten hauptsächlich bei Einlagerung von Cholesterol in die Membran auf (42). Die größte Unsicherheit bei der Auswertung der EM - Aufnahmen besteht in der Auszählung der kleinen Vesikel in der ersten Kolonne des Histogrammes Abb. 12. Eine Abschätzung des Fehlers, der sich hieraus maximal ergeben kann, zeigt, daß der errechnete Wert für den Radius auf 10 % genau ist.

Für die verwendeten Phospholipide ergeben sich die folgenden Werte:

Radius $\overline{r} = \sqrt[3]{\langle r^3 \rangle} \approx 90$ nm

Volumen $\overline{V} \approx 3 \cdot 10^6$ nm^3

Mit einer Fläche von 0,65 nm^2 für den Platzbedarf einer EPC - Kopfgruppe (99) enthält ein Monolayer ca. 160.000 Phosphatidylcholinmoleküle und das gesamte Vesikel dementsprechend 320.000 .

4.1.2. Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie ist unter konstanten Bedingungen jede eluierte Substanz durch ihr Elutionsvolumen V_e charakterisiert (100). Zu Abmessung, Ausschluß- und Bettvolumen der verwendeten Säulen siehe Kap. 2.5.3., Material: Sepharose CL-2B.

Abb. 13 zeigt die Elutionsprofile, wie sie bei Experimenten nach Kap. 2.5.3. erhalten wurden. Auf Position I werden die REV eluiert, auf Position II die DNA - Stücke und auf Position III die Fragmente nach der Verdauung von poly A·poly U nach Kap. 2.5.2. Ebenfalls eingezeichnet ist das Elutionsprofil von Vesikeln ohne Nukleinsäure. Das gleiche Elutionsprofil ergibt sich bei der Chromatographie von poly A·poly U Doppelsträngen. REV und poly A·poly U werden beide im Ausschlußvolumen eluiert. In Tab. 4 sind die V_e - Werte der verwendeten Substanzen zusammengestellt.

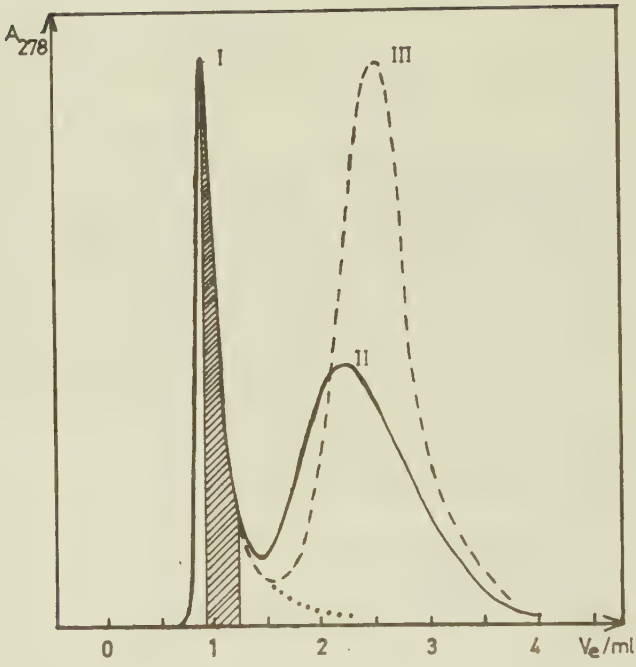

Abb. 13 Elutionsprofile der Gelchromatographie

———— Elutionsprofil von Vesikeln (I) und DNA (II)

———— Elutionsprofil von Vesikeln (I) und RNA - Fragmenten (III)

———..... Elutionsprofil von leeren Vesikeln und von poly A·poly U

▨ Fraktionen, die zu weiteren Experimenten verwendet wurden

	V_e/ml
poly A·poly U	1,0
REV	1,0
DNA - Stücke	2,2
RNA - Fragmente	2,7

Tab. 4 V_e - Werte der chromatographierten Substanzen unter den Bedingungen nach Kap. 2.5.3.

In der Literatur ist beschrieben, daß Vesikel durch Chromatographie über Sephacryl S - 1000 ihrer Größe nach fraktioniert werden können, da die Porengröße dieses Materials bei 300 nm liegt (101). Die Elutionsprofile von EPC - REV über Sephacryl S - 1000 - Säulen (0,5 cm Durchmesser, 30 cm Länge) bestätigten zwar qualitativ die Form der nach Abb. 12 elektronenmikroskopisch erhaltenen Größenverteilung der Vesikel, das eigentliche Ziel der präparativen Fraktionierung der Vesikel nach Größenintervallen war jedoch nicht zu erreichen. Ursache hierfür war, daß große Mengen Lipid vom Säulenmaterial adsorbiert wurden. Erst nach vollständiger Sättigung der Säule, die mit einer irreversiblen Kontraktion der Säule um 1 cm verbunden war, wurden auswertbare Elutionsprofile erhalten. Allerdings war es auch durch Erhöhung der Lipidkonzentration im Auftragsvolumen nicht möglich, in einer Fraktion die zur thermischen Analyse benötigte Lipidmenge zu isolieren. Bereits nach wenigen Chromatogrammen war das Säulenmaterial nicht mehr zu verwenden. Daher wurde auf die Anwendung von Sephacryl S - 1000 verzichtet und ausschließlich mit Sepharose CL - 2B gearbeitet.

4.1.3. Stabilität

Die Stabilität der verwendeten Lipide wurde getestet, indem eine Vesikelpräparation dünnschichtchromatographisch untersucht wurde (vgl. Kap. 2.2.). Auch wenn die Vesikellösung durch die thermische Denaturierung der eingeschlossenen Nukleinsäure zuvor auf 75°C erhitzt wurde (siehe unten), zeigten sich keine Flecken auf der Position des Lysolipids. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Lipide im Verlauf der Vesikelpräparation und der Messungen nicht degradieren.

Zum Test auf reversible Assoziation von REV wurde überprüft, ob eine Vesikelpräparation das Lambert - Beer'sche Gesetz erfüllt. Von einer hochkonzentrierten REV - Lösung ausgehend, wurde die Trübung bei 235 nm in Abhängigkeit von der Verdünnung der Lösung gemessen. Absorption und Verdünnung waren linear korreliert, so daß das Lambert - Beer'sche Gesetz erfüllt war. Aggregation von PC - Vesikeln ist auch aufgrund ihrer starken Abstoßungspotentiale nicht zu erwarten (54).

Die thermische Stabilität der Vesikel wurde gelchromatographisch getestet. In DOPC - Vesikeln (REV) wurde bei 10 mM NaCl 187 bp DNA eingeschlossen. Nach der thermischen Denaturierung der Nukleinsäure (vgl. Kap. 4.2.6.), in deren Verlauf die Lösung innerhalb von 3 h auf 75°C aufgeheizt wurde, wurde ein Aliquot der Lösung chromatographiert. Im Chromatogramm war an der Stelle der DNA (Position II, Abb. 13) kein Peak erkennbar. Auch aus dem in Kap. 4.2.2. beschriebenen Experiment muß auf eine hohe thermische Stabilität der Vesikel geschlossen werden.

Über die Langzeitstabilität von REV wird in der Literatur berichtet (43).

4.1.4. Nukleinsäureeinschluß

Der Einschluß von Nukleinsäure in nach Kap. 2.5.1. präparierten SUV war nicht möglich. Bereits tRNA konnte nicht in SUV eingeschlossen werden. Wie eine einfache Abschätzung zeigt, würde ein tRNA - Molekül in einem SUV von 10 nm Radius ein Volumen von ca. 10% des Vesikels ausfüllen. Möglicherweise ist dies die Ursache dafür, daß der Einschluß von Nukleinsäure in SUV nicht gelang.

Zur Bestimmung der optimalen Nukleinsäurekonzentration zum Einschluß in Vesikel wurden REV bei verschiedenen tRNA - Konzentrationen präpariert. Ausgewertet wurde die Fläche der Peakes der Vesikel im Elutionsprofil des Säulenchromatogrammes (Position I in Abb. 13). Da bei der Detektionswellenlänge von 278 nm Vesikel und Nukleinsäure zur Extinktion beitragen, wurde angenommen, daß die Flächenvergrößerung des Peaks in Anwesenheit von Nukleinsäure gegenüber der Peakfläche einer Präparation in Abwesenheit von Nukleinsäure auf die zusätzliche Extinktion eingeschlossener Nukleinsäure zurückzuführen ist. Zur Auswertung wurde bei jeder Meßreihe der Wert der Peakfläche auf den Wert der ersten Präparation ohne Nukleinsäure normiert. Der Quotient der Peakflächen wird in Abb. 14 als f bezeichnet. In dieser Abbildung ist der Mittelwert von jeweils vier f - Wert - Messungen gegen die tRNA - Konzentration der Lösung, in der die Vesikel präpariert wurden, aufgetragen. Man erkennt, daß bis zu einer Konzentration von 10 nmol tRNA / ml nur kleine Nukleinsäuremengen eingeschlos-

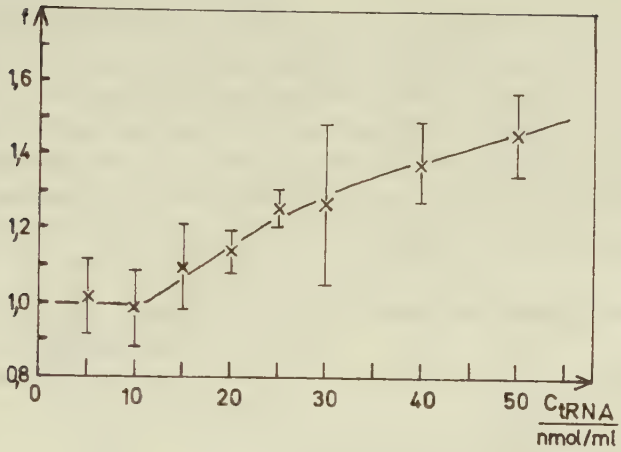

Abb. 14 Einschluß von Nukleinsäure (tRNA) in EPC - Vesikel in Abhängigkeit von der Nukleinsäurekonzentration. Auf der Ordinate ist die Fläche von Peak I aus Abb. 13 aufgetragen, normiert auf den Wert der Fläche einer Präparation ohne Nukleinsäureeinschluß.

sen werden, zu deren Nachweis diese Methode zu unempfindlich ist. Die Einschlüsse wurden bei einer Ionenstärke von 10 mM NaCl bestimmt.

Da in der Literatur von einem abnormen Einschlußverhalten von Phosphatidylcholinvesikeln berichtet wird, das darin besteht, daß bei sehr hohen Nukleinsäurekonzentrationen der Nukleinsäureeinschluß wieder geringer wird (102), wurde die Nukleinsäuremenge nicht weiter erhöht. Bei allen Präparationen wurde mit der 40 nmol tRNA / ml entsprechenden Konzentration von 25 A_{260}/ml gearbeitet.

Zur Absolutbestimmung des Nukleinsäureeinschlusses in EPC - REV wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Kap. 2.5.1. wurden EPC - REV in einer Lösung von 25 A_{260}/ml 187 bp DNA bei 10 mM NaCl präpariert. Nicht eingeschlossene Nukleinsäure wurde nach Kap. 2.5.3. abgetrennt. Aus den in Abb. 13 (Kap. 4.1.2.) angegebenen Vesikelfraktionen wurde nach Kap. 2.6.1. und Kap. 2.6.2. Nukleinsäure-

und Lipidgehalt bestimmt. Die Fraktion enthielt 380 nmol Lipid und 0,18 A_{260} (nach Tab. 3 Kap. 3.2.3. entsprechend 0,06 nmol) Nukleinsäure. Zur Auswertung wurden folgende Daten verwendet: Radius, Volumen und Lipidgehalt eines Vesikels aus Kap. 4.1.1. und Molekulargewicht der DNA aus Tab. 3. Das Volumen eines DNA - Moleküls von 187 bp ohne Hydrathülle wurde zu 337 nm^3 berechnet. Damit ergaben sich:

Eingeschlossenes Volumen	:	~2,2 µl, d.h. ~6 liter pro mol Lipid
Eingeschlossene Nukleinsäure	:	~0,06 nmol, d.h. ~$0{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol Nukleinsäure pro mol Lipid
Konzentration der Nukleinsäure im Vesikel	:	~80 A_{260}/ml
Zahl der Nukleinsäuremoleküle pro Vesikel	:	~50
Anteil des Vesikelvolumens, das durch Nukleinsäure ausgefüllt ist	:	~1%

Zur weiteren Auswertung, die die Ergebnisse aus Kap. 4.2. berücksichtigt, siehe Kap. 5.2.

Da die in Kap. 2.6.1. beschriebene organische Lipidextraktion bisher nur für die präparative Lipidisolierung benutzt wurde (34), mußte noch die Genauigkeit der Methode bestimmt werden. Der Fehler der quantitativen Phosphatanalyse wurde mittels linearer Regression der Eichgeraden und der Analyse von eingewogenem Lipid zu 3% bestimmt. Die Genauigkeit der Lipidextraktion wurde bestimmt, indem REV - Präparationen halbiert wurden und der Phosphatgehalt der einen Hälfte direkt, der der anderen Hälfte nach Extraktion bestimmt wurde. Die Abweichungen betrugen ca. 20%. Die Genauigkeit der Nukleinsäurebestimmung wurde gemessen, indem REV in 1 A_{260} tRNA / ml Lösung präpariert wurden und die Nukleinsäure ohne vorherige Abtrennung von den Vesikeln aus der Präparationslösung extrahiert wurden. Die Abweichungen betrugen ca. 30%. Die angegebenen Daten dürfen daher nur als Abschätzungen angesehen werden.

Die Ionenstärkeabhängigkeit des Nukleinsäureeinschlusses in Vesikel wurde aus der Hypochromie der thermischen De-

naturierung eingeschlossener DNA bestimmt. 187 bp DNA wurde, wie in Kap. 4.2.3. beschrieben, bei 10, 15, 30 und 50 mM NaCl in EPC - REV eingeschlossen und anschließend thermisch denaturiert. Die Denaturierungsprofile, wie sie in Abb. 20 dargestellt sind, wurden auf gleiche Hypochromie normiert, wie in Kap. 4.2.3. begründet. Die absolut gemessenen Hypochromien, die ein Maß für die vorhandene Nukleinsäuremenge sind, sind in Abb. 15 gegen die Ionenstärke aufgetragen.

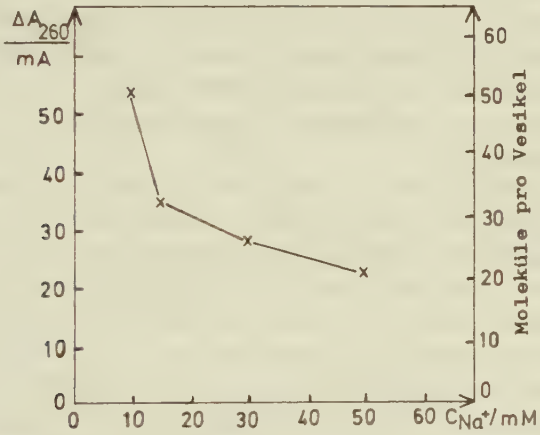

Abb. 15 Einschluß von 187 bp DNA in EPC - Vesikel in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration.

Man sieht, daß der Nukleinsäureeinschluß mit steigender Ionenstärke abfällt. Der Abfall des Einschlusses ist stärker als exponentiell. Mit der oben angegebenen Absolutbestimmung des Einschlusses läßt sich unter der Voraussetzung, daß sich die Vesikelgröße mit der Ionenstärke nicht verändert , die Hypochromie ΔA_{260} in die Zahl der Nukleinsäuremoleküle pro Vesikel umrechnen. Fehlerangaben wurden nicht gemacht, da jeder Punkt nur einmal gemessen wurde.

Durch Einschluß von tRNA in Vesikel aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischungen (Beimischung von PS in

Molenbruchschritten von 0,2, vgl. auch Kap. 4.2.4.) bei 30 mM NaCl und anschließende Nukleinsäurebestimmung nach Kap. 2.6.2. ergab sich, daß der Nukleinsäureeinschluß im Rahmen der Meßgenauigkeit von der Zusammensetzung der Vesikel unabhängig ist.

4.1.5. Extern adsorbierte Nukleinsäure

Hoffman et al. berichteten, daß multilamellare Vesikel (MLV) aus EPC, die bei niedrigen Ionenstärken (20 mM Tris HCl, 1 mM $MgCl_2$) Nukleinsäure einschließen, einen Teil der Nukleinsäure bei höheren Ionenstärken (140 mM NaCl) wieder freisetzen (14). Diese Beobachtung wird mit der Adsorption von Nukleinsäure auf der Außenseite der MLV erklärt. Die adsorbierte Nukleinsäure kann durch Waschen nicht entfernt werden (14).

Um zu untersuchen, ob nach den in Kap. 2.5. beschriebenen Präparationsschritten noch Nukleinsäure auf der Außenseite der REV gebunden ist, wurden folgende Experimente durchgeführt: REV wurden bei 10 mM NaCl und 25 A_{260}/ml poly A·poly U präpariert, mit Nuklease behandelt und chromatographisch gereinigt. Nach Erhöhung der Ionenstärke auf 100 mM oder 200 mM NaCl und RNase A - Zugabe zur Detektion von freigesetzter Nukleinsäure wurde eine Absorptionszunahme nicht beobachtet.

Weiterhin wurden REV in 25 mM NaCl - Standardpuffer präpariert, abzentrifugiert, in 25 mM NaCl, 100 A_{260}/ml poly A·poly U - Lösung suspendiert und bei Zimmertemperatur 1 h inkubiert. Danach wurde die Nukleinsäure mit RNase A degradiert und die Vesikel chromatographisch gereinigt. Anschließend wurde die Probe nach Kap. 2.9. und 4.2.1. im Sigma ZWS 11 thermisch analysiert. Existierte gebundene - und damit nukleasegeschützte - Nukleinsäure, so wäre im Bereich von 58°C eine Absorptionszunahmen bei 260 nm infolge der Denaturierung der Nukleinsäure zu erwarten gewesen. Dies wurde nicht beobachtet. Insgesamt muß daher geschlossen werden, daß REV unter den hier gewählten Bedingungen keine Nukleinsäure extern binden.

4.1.6. Phasenübergänge des DPPC

Nach Kap. 2.5.1. präparierte DPPC - Vesikel wurden nach der Säulenchromatographie auf das zehnfache Volumen verdünnt. Anschließend wurde nach Kap. 2.9. die optische Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt. Deutlich sind die in Kap. 3.1.5. beschriebenen Phasenübergänge bei 32°C und bei 41°C zu erkennen. Vgl. hierzu auch Kap. 3.1.7.

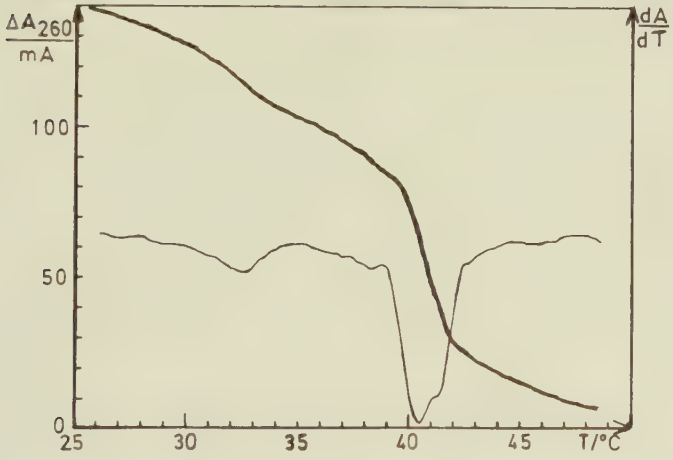

Abb. 16 Absorption der DPPC - REV bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Eingetragen ist die gemessene Kurve und die erste Ableitung.

4.2. Thermische Denaturierung von Nukleinsäure in Lipidvesikeln

4.2.1. Extinktionsmessung an trüben Lösungen

Trübungskorrektur

In Abb. 16 ist ein Spektrum einer nukleinsäurehaltigen Vesikellösung abgebildet. Wie man durch Vergleich mit einem Spektrum von Vesikeln ohne Nukleinsäureeinschluß abschätzen kann, trägt die Extinktion der Nukleinsäure bei 260 nm etwa mit 20% zur Gesamtextinktion bei. Man erkennt ebenfalls, daß in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus Kap. 4.1.4. etwa 0,15 A_{260}/ml Nukleinsäure in der Vesikelpräparation enthalten sind.

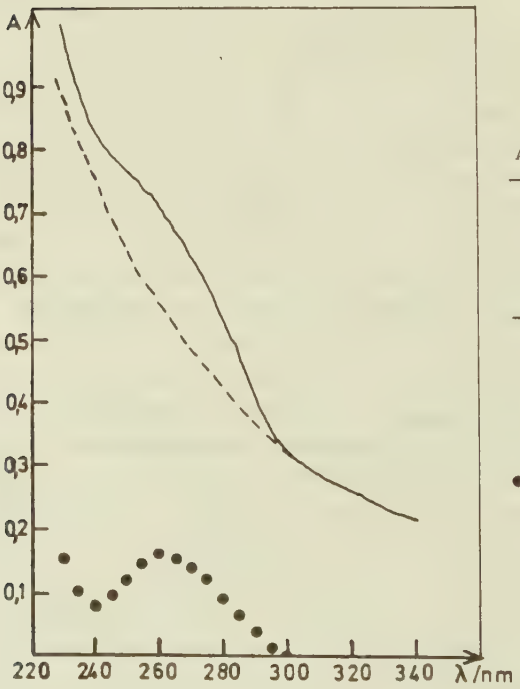

Abb. 17

——— Spektrum einer EPC - Vesikelpräparation mit eingeschlossener 187 bp DNA bei 10 mM NaCl in Standardpuffer.

- - - - - Spektrum einer EPC - Vesikelpräparation ohne Nukleinsäure, bei 320 nm auf gleichen Absorptionswert normiert.

● ● ● ● Durch Subtraktion der Spektren erhaltenes Nukleinsäurespektrum der 187 bp DNA.

Zum Verlust an Lichtintensität in einer Lösung, die Nukleinsäure und Liposomen enthält, tragen somit die Licht-

streuung an Vesikeln (Trübung) und die Absorption durch Nukleinsäure bei. Bei der Messung der thermischen Denaturierung von Nukleinsäure in Liposomen ändern sich ebenfalls beide Anteile der Extinktion. Diese Anteile lassen sich trennen, wenn die Extinktion A in Abhängigkeit von der Temperatur T sowohl bei 260 nm als auch bei 320 nm verfolgt wird. Bei 260 nm tragen zur gemessenen Extinktion beide Effekte bei, bei 320 nm absorbiert die Nukleinsäure (NA) nicht, so daß nur die Trübung durch die Vesikel (REV) gemessen wird. Somit gilt:

$$A_{260}(T) = A^{NA}_{260}(T) + A^{REV}_{260}(T)$$
$$A_{320}(T) = A^{REV}_{320}(T) \qquad \text{Gl. 8}$$

Das Verhältnis $A^{REV}_{260}(T) / A^{REV}_{320}(T)$, das nur die Extinktionsanteile der Vesikel beschreibt, erhält man direkt durch Messung an Liposomen ohne Nukleinsäureeinschluß, wie in Abb. 18a dargestellt. Mit diesem Quotienten läßt sich durch Messung von $A_{260}(T)$ und $A_{320}(T)$ bei der thermischen Denaturierung von Nukleinsäure in Vesikeln der Trübungseffekt der Vesikel rechnerisch nach Gl. 8 eliminieren und man erhält die Extinktion der Nukleinsäure in Vesikeln bei 260 nm, $A^{NA}_{260}(T)$. Abb. 18b zeigt die Extinktion einer Lösung von EPC - Vesikeln (REV) mit eingeschlossener 179 bp DNA bei 260 nm und 320nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Kurve wird, wie in Kap. 2.9. beschrieben, in dieser Form registriert und auf Diskette gespeichert. Nach der Eliminierung des Trübungseffektes ergibt sich die Extinktion der Nukleinsäure bei 260 nm, wie sie in Abb. 18c gezeichnet ist. Alle in dieser Arbeit dargestellten Denaturierungsprofile in Vesikeln eingeschlossener Nukleinsäuren mit Ausnahme der Abbildungen 18b und 35b sind in der korrigierten Form gezeichnet. Auch zur Darstellung der ersten Ableitung wurde die korrigierte Form benutzt.

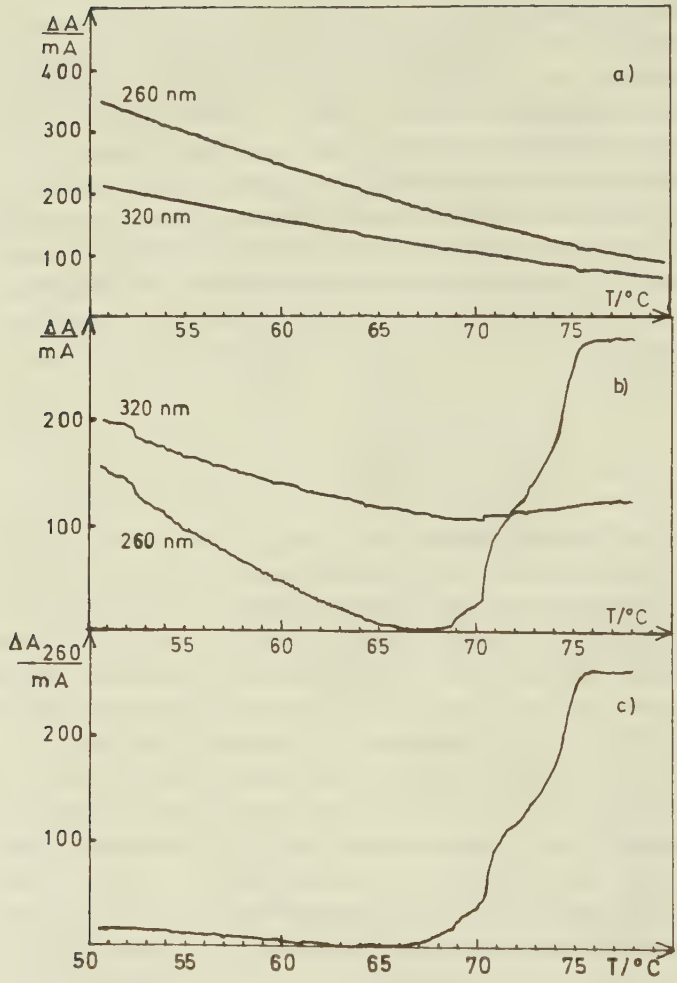

Abb. 18 Trübungskorrektur von Denaturierungsprofilen in Vesikel eingeschlossener Nukleinsäure am Beispiel der 179 bp DNA, eingeschlossen in EPC - REV bei 10 mM NaCl in Standardpuffer.

a) Extinktion einer Lösung von EPC - REV bei 260 nm und 320 nm in Abhängigkeit von der Temperatur.

b) Extinktion einer Lösung von EPC - REV, eingeschlossen 179 bp DNA, bei 260 nm und 320 nm in Abhängigkeit von der Temperatur.

c) Kurve b), korrigiert nach a). Extinktion der DNA in Vesikeln bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur.

Fehlerbetrachtung

Nach (26) und (86) befindet sich das System bei der gewählten Aufheizrate (vgl. Kap. 2.9.) von 0,2°C/min stets im Gleichgewicht des Temperaturausgleiches und der Strukturänderung der Nukleinsäuren. Es zeigte sich, daß auch bei einer Aufheizrate von 0,3°C/min die Kurvenform im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht verändert wurde ((26) und diese Arbeit), so daß bei der Denaturierung von Nukleinsäuren bei Temperaturen über 70°C mit 0,3°C/min geheizt wurde.

Bei der Untersuchung von reiner Nukleinsäure ist mit der verwendeten Gerätekombination (vgl. Kap. 2.9.) nach (26) bei einem Signal - Rausch - Verhältnis von 190:1 und bei der absoluten Genauigkeit der Temperaturmessung von $\pm 0,5$°C eine Reproduzierbarkeit für T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von $\pm 0,1$°C zu erzielen. Bei der Messung der Denaturierung von Nukleinsäuren in Vesikeln sind solche Genauigkeiten nicht erreichbar. Da 80% der Gesamtextinktion auf die Trübung durch die Vesikel entfallen, verschlechtert sich das Signal - Rausch - Verhältnis auf 50:1 (jeweils bestimmt aus der gemessenen Kurve, nicht aus der ersten Ableitung). Bei der Bestimmung der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte war die Genauigkeit von System zu System verschieden, aber schlechter als bei der Bestimmung der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte frei gelöster Nukleinsäure. Außer beim Einschluß von poly A·poly U in Vesikel aus reinem Phosphatidylcholin war die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (vgl. Kap. 5.1.) stets besser als die Genauigkeit bei der Auswertung einer Messung. Die insgesamt erhaltenen Fehlerbalken sind in den Diagrammen jeweils eingetragen. Die angegebenen Hypochromieverhältnisse waren auf $\pm 10\%$ reproduzierbar.

4.2.2. Allgemeine Charakterisierung der thermischen Denaturierung von Nukleinsäure in Vesikeln

Die Übergänge der Nukleinsäuren

Sowohl die 179 bp als auch die 187 bp DNA - Stücke denaturieren, frei gelöst in Standardpuffer, in einem einzigen Übergang hochkooperativ (103). Die Denaturierung der 187 bp DNA erfolgt bei 30 mM NaCl noch reversibel, aber

nicht mehr bei 15 mM NaCl. Auch poly A·poly U Doppelstränge denaturieren bei einer definierten Temperatur (104).

Bei der thermischen Denaturierung von Nukleinsäuren in Vesikeln aus reinem Phosphatidylcholin oder phosphatidylcholinhaltigen Lipidgemischen zeigen die Nukleinsäuren bis zu einer Grenzionenstärke, die zwischen 50 und 100 mM NaCl liegt, grundsätzlich zwei Helix - Knäuel - Übergänge. Als Beispiel sind in Abb. 19 die Denaturierungsprofile des 179 bp DNA - Stückes bei 10 mM NaCl frei in Lösung und eingeschlossen in EPC - Vesikel miteinander verglichen. In gleicher Weise verhalten sich auch die 187 bp DNA und poly A·poly U.

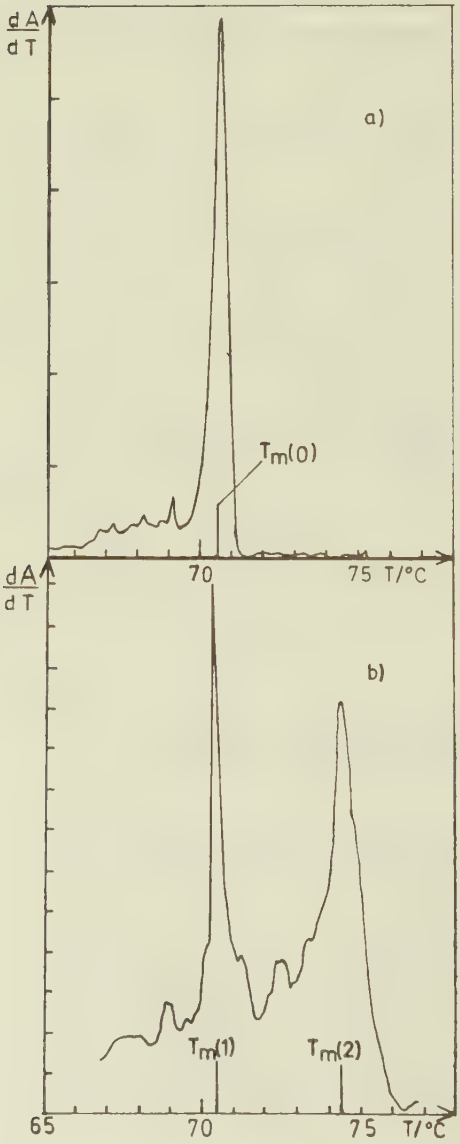

Abb. 19

Differenzierte Denaturierungsprofile der 179 bp DNA (10 mM NaCl, Standardpuffer)
a) frei in Lösung,
b) eingeschlossen in EPC - Vesikel (REV).
An den Ordinaten sind keine Werte eingetragen, da - wie auch bei den anderen Kurven - nicht auf die vorhandene Nukleinsäuremenge normiert wurde.

Allgemein zeigt sich, daß der erste der beiden Übergänge eingeschlossener Nukleinsäure in T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Wert mit dem Übergang der frei gelösten Nukleinsäure übereinstimmt, während der T_m - Wert des neu hinzugekommenen Überganges bei höherer Temperatur liegt und der $\Delta T_{1/2}$ - Wert größer ist als bei frei gelöster Nukleinsäure.
Es sind:

$$\Delta T_m := T_m(2) - T_m(1) = T_m(2) - T_m(0) > 0$$
$$\Delta(\Delta T_{1/2}) := \Delta T_{1/2}(2) - \Delta T_{1/2}(1) = \Delta T_{1/2}(2) - \Delta T_{1/2}(0) > 0 \qquad \text{Gl. 9}$$

Der Index (0) bezieht sich auf den Übergang frei gelöster Nukleinsäure, (1) bezieht sich auf den Übergang eingeschlossener Nukleinsäure mit den Eigenschaften freier, und (2) bezieht sich auf den neu hinzugekommenen Übergang. ΔT_m wird im weiteren Verlauf der Arbeit als "Stabilisierung", $\Delta(\Delta T_{1/2})$ als "Verbreiterung" bezeichnet.

Denaturierung in Anwesenheit von RNase A

Während der erste Übergang von Nukleinsäure herrührt, die offensichtlich keiner Beeinflussung unterliegt, muß sich in den veränderten T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werten des zweiten Überganges der Einfluß des Lipids bemerkbar machen. Um zu überprüfen, ob der erste Übergang von nicht eingeschlossener Nukleinsäure herrührt, die entweder nicht vollständig abgetrennt oder während der Gelchromatographie durch Zerfall von Vesikeln freigesetzt wird, wurde das folgende Experiment durchgeführt:

Poly A·poly U wurde bei 50 mM NaCl (Standardpuffer) in Vesikel aus 80% EPC und 20% PG eingeschlossen. Dabei wurde insgesamt nach Kap. 2.5. verfahren. Zu der nach der Gelchromatographie auf 600 µl verdünnten Fraktion wurden in die Küvette zur Messung der thermischen Denaturierung 10 µl einer RNase A - Stammlösung (2 mg/ml) hinzupipettiert. Hierbei war innerhalb 10 min keine Absorptionszunahme bei 260 nm zu beobachten. Daraus ist zu schließen, daß keine der Nuklease frei zugängige Nukleinsäure vorlag. Zur Kontrolle wurde poly A·poly U zugegeben. Die Nukleinsäure wurde unter Absorptionserhöhung vollständig degradiert. Danach wurde

zuerst die thermische Denaturierung und anschließend die Renaturierung der Nukleinsäure in den Vesikeln nach Kap. 2.9. in Anwesenheit der RNase A optisch verfolgt. Die Nukleinsäure denaturierte in zwei Übergängen bei 52,2°C und 55,5°C. Beide Übergänge wurden bei der Renaturierung bei einem Hypochromieverlust von lediglich 12% wieder gemessen, wobei die Temperaturen 51,8°C und 54,3°C betrugen. Um die Frage zu klären, ob die RNase durch die Lipidvesikel oder die hohen Temperaturen inaktiviert wird, wurden vor und nach der thermischen Analyse je 10 µl der nukleasehaltigen Vesikellösung zu je 700 µl einer poly A·poly U - Lösung (0,3 A_{260}/ml) gegeben, wobei die Extinktion bei 260 nm verfolgt wurde. Die Nukleinsäure wurde in beiden Fällen innerhalb von maximal 12 min vollständig degradiert. Dies heißt, daß die Aktivität der Nuklease weder durch die Lipidvesikel noch durch das Aufheizen gestört wird.

Zur Kontrolle wurden noch zwei weitere Experiment durchgeführt. Zum einen wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt, ohne daß von außen RNase A zugegeben wurde. Das Verhalten der Nukleinsäure entsprach genau dem oben beschriebenen. Es wurden zwei Übergänge gemessen, die bei 52,0°C und bei 55,6°C lagen. Zum anderen wurden Vesikel präpariert, die keine Nukleinsäure enthielten. Anschließend wurde extern 0,1 A_{260}/ml poly A·poly U zugegeben. Die thermische Analyse zeigte nur den Übergang freier Nukleinsäure bei 52,0°C. Nach der Renaturierung ließ sich die RNA vollständig mit RNase A degradieren. Wie auch aus den in Kap. 4.1.5. beschriebenen Experimenten muß geschlossen werden, daß Nukleinsäure, die nicht in Vesikel eingeschlossen ist, nicht von den Vesikeln beeinflußt wird und auch nicht vor Nukleaseangriff geschützt ist. Damit ergeben sich aus dem Experiment folgende Konsequenzen:

1) Die Nukleinsäure liegt in Vesikeln in zwei verschiedenen Populationen vor.
2) Beide Populationen sind vollständig vor Nukleaseangriff geschützt.
3) Beide Populationen sind so organisiert, daß eine vollständige Renaturierung möglich ist.

4) Extern zugegebene RNase A beeinflußt das Verhalten der beiden Nukleinsäurepopulationen in den Vesikeln nicht.

Denaturierung in Anwesenheit von DNase I

Bei der Präparation DNA - haltiger Vesikel wird die nicht eingeschlossene Nukleinsäure nicht enzymatisch degradiert (wie dies nach RNA - Einschlüssen geschieht), sondern nur gelchromatographisch abgetrennt. Um zu untersuchen, ob in der Vesikellösung noch externe, nicht abgetrennte DNA vorhanden ist, wurden folgende Experimente durchgeführt:

187 bp DNA wurde bei 30 mM NaCl (Standardpuffer) in EPC - REV eingeschlossen. Nach der Gelchromatographie wurde mit 2 units/ml DNase I bei 1 mM $MgCl_2$ inkubiert (vgl. Kap. 2.5.3.) und nach 30 min mit 2 mM EDTA gestoppt. Da sich die Extinktion bei 260 nm während der Inkubation nicht änderte, ist zu folgern, daß keine freie Nukleinsäure vorliegt. Um zu überprüfen, ob das Enzym durch die Membran desaktiviert wird, wurde zu einer Vesikelpräparation extern 0,1 A_{260}/ml 187 bp DNA hinzugegeben. 2 units/ml DNase I degradierten bei 1 mM Mg^{++} die DNA innerhalb von 15 min vollständig. Demzufolge wird die enzymatische Aktivität der Nuklease durch die Lipide nicht beeinflußt. Weiterhin wurde eine Vesikelpräparation mit eingeschlossener DNA mit Nuklease inkubiert und nach Abstoppen mit EDTA thermisch analysiert. Die Nukleinsäure denaturierte in zwei Übergängen. Die Hypochromie beider Übergänge zusammen betrug 0,05 A_{260} und entsprach damit der DNA - Menge, wie sie nach Kap. 4.1.4. (Abb. 15) und Kap. 4.2.1. in einer Vesikelpräparation eingeschlossen wird (0,15 A_{260}). Bei einer Abkühlungsrate von 0,1°C/min wurden bei der Renaturierung beide Übergänge wieder erhalten. Hieraus ist zu schließen, daß in den Vesikelpräparationen keine DNA außerhalb der Vesikel existierte, und beide Übergänge von eingeschlossener DNA stammten.

Zur Kontrolle wurde eine thermische Analyse von in Vesikeln eingeschlossener DNA durchgeführt, ohne daß extern DNase I zugegeben wurde. Hierbei zeigte sich allerdings ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen des vorigen Abschnittes. Lediglich der T_m - Wert des "ersten" Überganges, der dem

T_m - Wert der freien DNA entspricht, war unabhängig davon, ob extern DNase I zugegeben wurde. Der T_m - Wert des zusätzlichen Überganges war in Anwesenheit externer DNase I deutlich zu tieferen Temperaturen bis hin zu Destabilisierungen ($\Delta T_m < 0$) verschoben. Um zu untersuchen, ob der Mg - EDTA - Komplex oder eine DNA - DNase - Wechselwirkung für diesen Effekt verantwortlich ist, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde eine Vesikelpräparation mit eingeschlossener DNA extern mit 1 mM Mg^{++} versetzt und nach 30 min mit 2 mM EDTA. Bei der thermischen Denaturierung lagen die beiden Übergänge der DNA bei den gleichen Temperaturen, wie sie in Abwesenheit von Protein, Magnesium und EDTA gemessen wurde. Ein Einfluß des Mg - EDTA - Komplexes auf die Position des zweiten Überganges kann daher ausgeschlossen werden. Zum anderen wurde 0,1 A_{260}/ml frei gelöste 187 bp DNA in Anwesenheit von 2 units/ml DNase I thermisch denaturiert. Um eine Degradation der DNA zu verhindern, wurde die Denaturierung in 2 mM EDTA durchgeführt (30 mM NaCl, Standardpuffer). Die DNA denaturierte bei 68,2°C, genau wie in Abwesenheit des Enzyms. Es ist daher auch auszuschließen, daß die DNase I als eventuell einzelstrangbindendes Protein die Übergangstemperatur der Nukleinsäure erniedrigt. Von den vier im vorigen Abschnitt (Denaturierung in Anwesenheit von RNase A) dargestellten Ergebnissen lassen sich für diese Untersuchungen nur die ersten drei nachvollziehen. Es muß gefolgert werden, daß DNase I im Unterschied zu RNase A möglicherweise die Vesikelmembran verändert und auf diese Weise auch die Wechselwirkung zwischen Membran und DNA beeinflußt.

Insgesamt zeigte sich, daß mit der nach Kap. 2.5. beschriebenen Methode offensichtlich eine quantitative Abtrennung nicht eingeschlossener Nukleinsäure von der Vesikelpräparation möglich ist. Um die Wechselwirkung der Nukleinsäure mit der Lipidmembran nicht zu stören, wurde bei allen folgenden in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten keine Nukleasen zu fertig präparierten Vesikellösungen hinzugegeben.

4.2.3. Variation der Ionenstärke

Ionenstärke im Vesikel

Bei der Präparation von Vesikeln nach Kap. 2.5.1. wird im Vakuum organisches Lösungsmittel verdampft. Da hierbei auch 20% Wasser verloren gehen, konzentriert sich der NaCl - Gehalt des Puffers ebenfalls um 20%. Zwar läßt sich abschätzen, daß die T_m - Werterhöhung der Nukleinsäure infolge einer Ionenstärkeerhöhung dieser Größenordnung deutlich kleiner sein muß als die gemessenen Stabilisierungen ΔT_m, dennoch war es notwendig, zu untersuchen, ob sich die veränderte Ionenstärke im Vesikel nach der Gelchromatographie der vorgegebenen Ionenstärke des umgebenden Mediums angleicht. Hierzu wurde folgendes Experiment durchgeführt:

179 bp DNA wurde bei 10 mM NaCl (Standardpuffer) in EPC - REV eingeschlossen und nach der Gelchromatographie mit 10 mM NaCl in Standardpuffer thermisch denaturiert (vgl. Abb. 19). Die T_m- Werte lagen bei 70,5°C und 74,5°C (jeweils $\pm$0,5°C). Anschließend wurde 179 bp DNA bei 30 mM NaCl (Standardpuffer) in EPC - REV eingeschlossen und mit 10 mM NaCl in Standardpuffer gelchromatographiert. Die thermische Denaturierung ergab zwei Übergänge bei 70,5°C und 75,0°C (jeweils $\pm$0,5°C). Da vom Beginn der Gelchromatographie bis zur Messung des ersten Überganges etwa drei bis vier Stunden vergehen, läßt sich aus dem Ergebnis des Experimentes schließen, daß sich die Ionenstärke im Vesikel im Verlaufe dieser Zeit vollständig an die Ionenstärke des umgebenden Mediums angleicht. Somit entspricht die Ionenstärke im Vesikel der angegebenen Ionenstärke des verwendeten Puffers.

Aufgelöste Übergänge

Nach Kap. 3.1.4. und 3.2.2. werden die elektrischen Felder von Membran und Nukleinsäure mit steigender Ionenstärke zunehmend abgeschirmt. Um zu untersuchen, ob der Einfluß, den die Phosphatidylcholinmembran nach Kap. 4.2.2. auf einen Teil der Nukleinsäure ausübt, elektrostatische Beiträge hat, wurde Nukleinsäure in Phosphatidylcholinvesikeln bei verschiedenen Ionenstärken thermisch denaturiert. So wurden poly A·poly U und 187 bp DNA in EPC - REV bei verschiedenen Ionenstärken

eingeschlossen und ihr Denaturierungsverhalten verfolgt.

In Abb. 20 sind die gemessenen Denaturierungsprofile der 187 bp DNA in Phosphatidylcholinvesikeln bei 10, 15, 30 und 50 mM NaCl in Standardpuffer abgebildet. Es ist zu sehen, daß der Abstand der beiden Übergänge (d.h. die Stabilisierung ΔT_m) mit zunehmender Ionenstärke abnimmt, bis er bei 50 mM NaCl in der gemessenen Kurve nicht mehr feststellbar ist (vgl. den folgenden Abschnitt). In Abb. 20 sind die Übergänge auf gleiche Höhe normiert. Diese Darstellung wurde gewählt, weil somit direkt aus den Meßkurven ablesbar ist, daß sich die Hypochromie bei allen Ionenstärken zu gleichen Anteilen auf die beiden Übergänge verteilt. 60% der Hypochromie entfallen auf den ersten Übergang, 40% auf den zweiten. Die absolut gemessenen Hypochromien der in Abb. 20 dargestellten Kurven sind Abb. 15 aus Kap. 4.1.4. zu entnehmen.

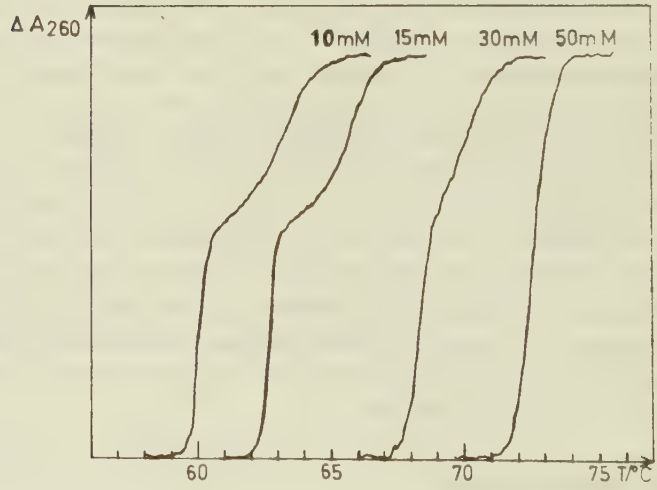

Abb. 20 Einfluß der Ionenstärke auf die Übergänge der 187 bp DNA in EPC - Vesikeln. Die Kurven sind auf gleiche Hypochromie normiert. Angegeben ist die NaCl - Konzentration im Standardpuffer.

In Abb. 21a und b sind die Abb. 20 entnommenen T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte gegen die Ionenstärke logarithmisch aufgetragen.

Man erkennt, daß die T_m - Werte des zweiten Überganges eine geringere Ionenstärkeabhängigkeit aufweisen als die des ersten, und daß die Halbwertsbreiten des zweiten Überganges mit zunehmender Ionenstärke abnehmen. In Abb. 21c ist die gemessene Verbreiterung des zweiten Überganges gegen dessen Stabilisierung aufgetragen (vgl. Gl. 9). Man erkennt, daß eine positive lineare Korrelation existiert. Diese Korrelation wird im folgenden Abschnitt bei der Auswertung des Überganges der DNA bei 50 mM NaCl benutzt.

In Abb. 22 sind gleichermaßen die Ergebnisse der Messungen an eingeschlossenem poly A·poly U aufgetragen. Die Ergebnisse entsprechen denen von Abb. 21.

Weiterhin wurden die Tm - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte der frei gelösten Nukleinsäuren bei den entsprechenden Ionenstärken bestimmt. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1) $T_m(1)$ und $\Delta T_{1/2}(1)$ stimmt bei allen Ionenstärken im Rahmen der Auswertegenauigkeit mit $T_m(0)$ und $\Delta T_{1/2}(0)$ überein. Zur Messung an DNA bei 50 mM NaCl siehe nächsten Abschnitt.
2) $T_m(2)$ zeigt eine reduzierte Ionenstärkeabhängigkeit, d.h. die Stabilisierung ΔT_m sinkt mit steigender Ionenstärke.
3) Die Verbreiterung des zweiten Überganges reduziert sich mit steigender Ionenstärke.
4) Es existiert eine Grenzionenstärke, bei welcher die beiden Übergänge zusammenfallen.
5) Stabilisierung und Verbreiterung sind positiv korreliert. In dem Maße, wie ΔT_m sinkt, sinkt auch $\Delta(\Delta T_{1/2})$.
6) Das Hypochromieverhältnis ist von der Ionenstärke unabhängig. 60% der Gesamthypochromie entfallen auf den ersten Übergang, 40% auf den zweiten.

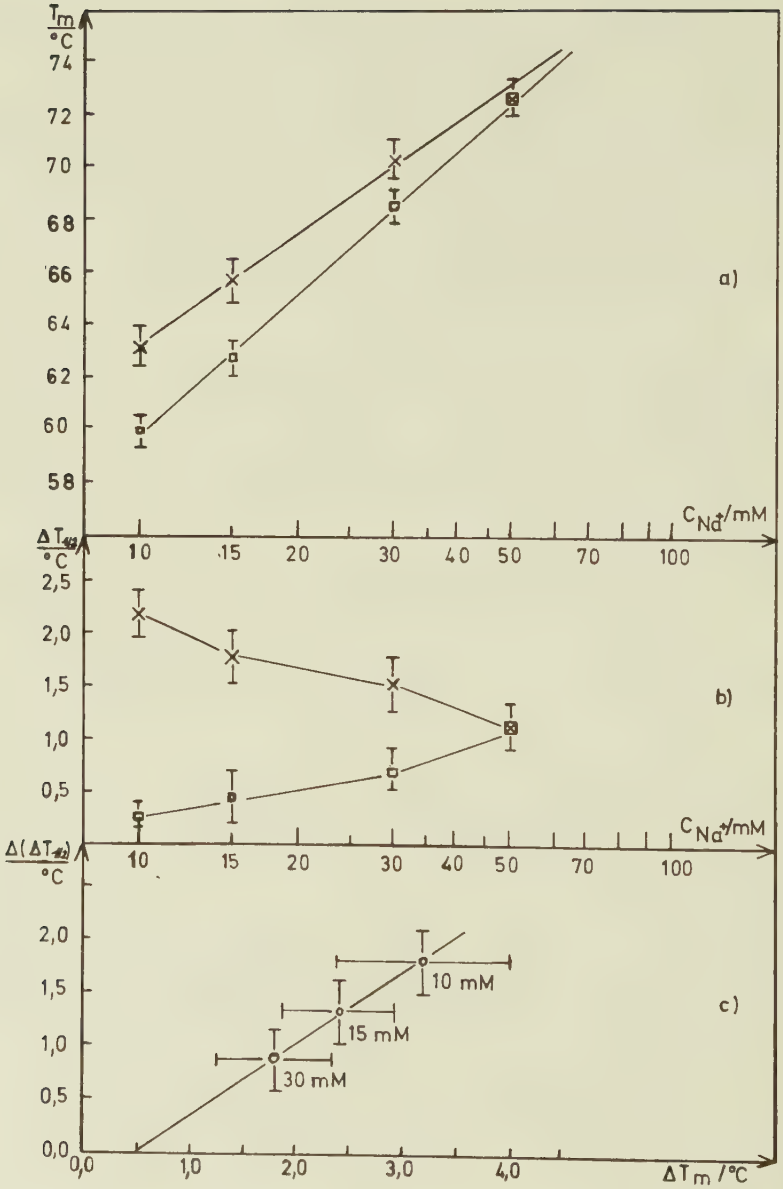

Abb. 21 Abhängigkeit der T_m - und ΔT_m - Werte von der Ionenstärke, gemessen an 187 bp DNA in EPC - REV (Standardpuffer). a) T_m - Werte, b) ΔT_m - Werte, c) Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung.

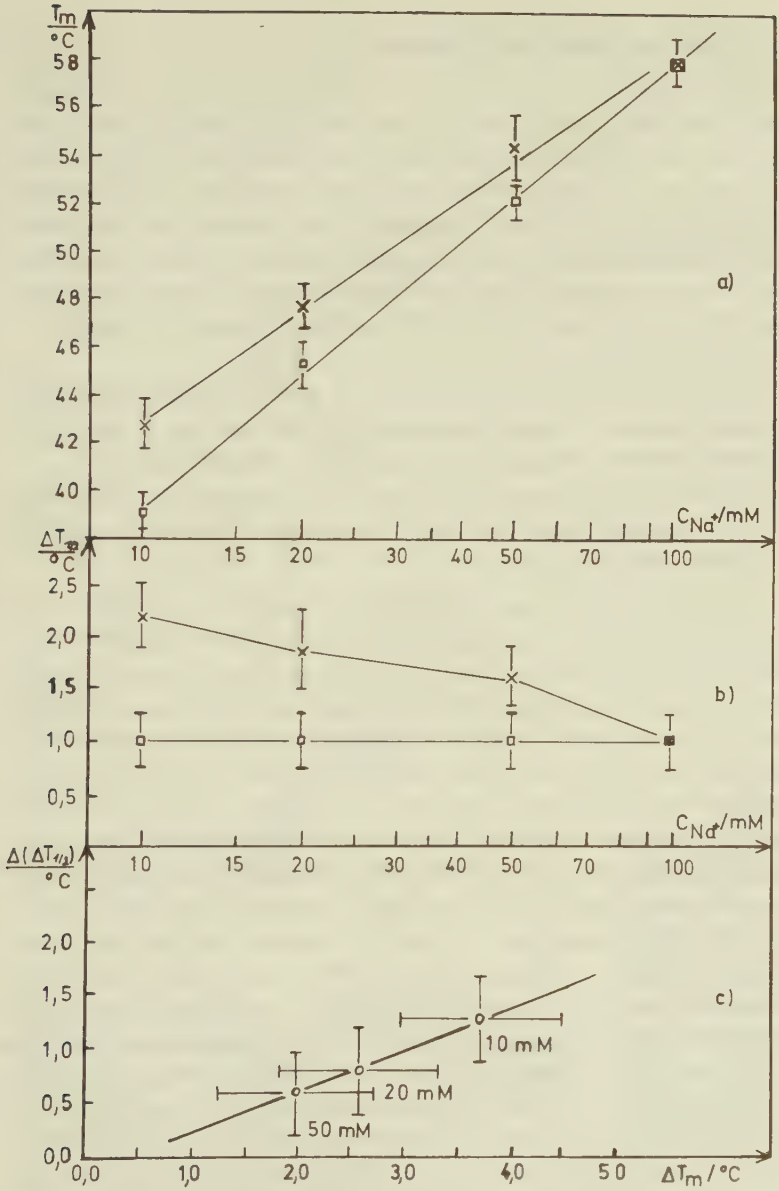

Abb. 22 Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Ionenstärke, gemessen an poly A·poly U in EPC - REV (Standardpuffer). a) T_m - Werte, b) $\Delta T_{1/2}$ - Werte, c) Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung.

Auflösung überlagerter Übergänge

Der Übergang des 187 bp DNA - Stückes in EPC - Vesikeln bei 50 mM NaCl (vgl. Abb. 20 und Abb. 21a und b) läßt sich auf zwei Weisen interpretieren. Zum einen als ein einziger, breiter und - relativ zur freien Nukleinsäure - zu höherer Temperatur verschobener Übergang, zum anderen als Übergang von zwei dicht beieinander liegenden, nicht mehr aufgelösten Übergängen. Im letzteren Fall können die beiden Übergänge separiert werden. Hierzu wurden folgende Voraussetzungen gemacht:

1) Wie bei allen anderen gemessenen Denaturierungsprofilen auch, hat der erste Übergang den gleichen T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Wert wie der Übergang frei gelöster Nukleinsäure.
2) Das Hypochromieverhältnis beider Übergänge ist 3:2, wie auch bei den anderen Denaturierungsprofilen dieser Meßreihe (Abb. 20).

An frei gelöster DNA wurde $T_m(0) := T_m(1) = 72{,}2^{\circ}C$ und $\Delta T_{1/2}(0) := \Delta T_{1/2}(1) = 0{,}6^{\circ}C$ bestimmt. Das differenzierte Denaturierungsprofil der frei gelösten DNA wurde gemäß der zweiten oben genannten Voraussetzung normiert und, wie in Abb. 23 dargestellt ist, von dem differenzierten Denaturierungsprofil der eingeschlossenen Nukleinsäure subtrahiert. Aus dem so erhaltenen Peak kann der $\Delta T_{1/2}(2)$ - Wert von $0{,}6^{\circ}C$ direkt abgelesen werden. Zur Bestimmung von $T_m(2)$, derjenigen Temperatur, bei welcher die Absorptionsänderung des Überganges die Hälfte des maximalen Wertes erreicht, muß der Peak noch numerisch integriert werden. Man erhält einen Wert von $72{,}8^{\circ}C$. Dies bedeutet, daß für den Fall, daß bei 50 mM NaCl zwei überlagerte Übergänge vorliegen, beide die gleiche Halbwertsbreite haben und $0{,}5^{\circ}C$ voneinander entfernt sind. Das gleiche Ergebnis ist der Extrapolation Abb. 21c zu entnehmen: Für gleiche Halbwertsbreiten (also $\Delta(\Delta T_{1/2}) = 0$) beträgt ΔT_m $0{,}5^{\circ}C$. Abb. 24 unterscheidet sich von Abb. 21 dadurch, daß für 50 mM NaCl die Werte der aufgelösten Übergänge eingetragen sind. Der errechnete $T_m(2)$ - Wert liegt auf der Geraden der übrigen $T_m(2)$ - Werte.

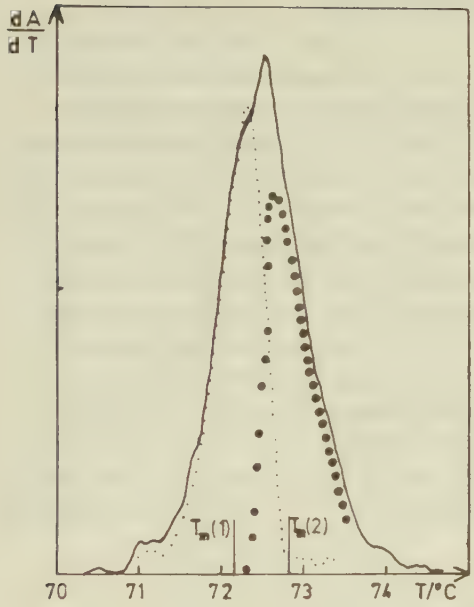

Abb. 23

Auflösung des Überganges der 187 bp DNA in EPC - REV bei 50 mM NaCl (Standardpuffer) in zwei Übergänge (vgl. Abb. 21).

——— Gemessener Übergang der DNA in Vesikeln

..... Gemessener Übergang frei gelöster DNA

• • • • Separierter zweiter Übergang

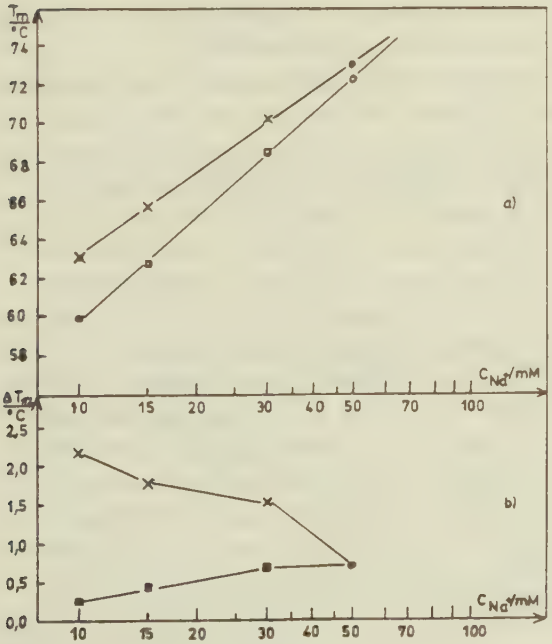

Abb. 24

Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Ionenstärke, gemessen an 187 bp DNA. Der Übergang bei 50 mM NaCl ist in zwei Übergänge aufgelöst. Vgl. auch Abb. 21. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.2.4. Variation der Kopfgruppen der Lipide

Versuchsdurchführung

Um zu untersuchen, wie sich das Verhalten der Nukleinsäurepopulationen unter dem Einfluß der Membran verändert, wurde 179 bp DNA und poly A·poly U in Vesikel verschiedener Lipidzusammensetzung eingeschlossen und thermisch analysiert. 179 bp DNA wurde in Vesikel aus Cardiolipin, 80% Phosphatidylcholin und 20% Stearinsäure und aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischungen wechselnder Zusammensetzung eingeschlossen, poly A·poly U in Vesikel aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - und aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylglycerol-Mischungen. Hierzu wurde die Gesamtmenge Phospholipid bei allen Vesikelpräparationen bei 0,6 µmol konstant gehalten (vgl. Kap. 2.5.1.), die Zusammensetzung aber in Molenbrucheinheiten von 0,2 variiert. Mit dem Fehler von 3% der Phosphatanalyse (Kap. 4.1.4.) sind die Molenbruchangaben auf 0,01 genau.

Denaturierung der 179 bp DNA

Alle Messungen an 179 bp DNA wurden bei einer Ionenstärke von 10 mM NaCl in Standardpuffer durchgeführt.

Eingeschlossen in Vesikel aus Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol), das zwei negative Ladungen pro Molekül trägt, denaturiert die 179 bp DNA nur in einem einzigen Übergang, dessen T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte mit den Werten frei gelöster Nukleinsäure übereinstimmen (T_m = 70,5°C, $\Delta T_{1/2}$ = 0,6°C).

Wird die DNA in Vesikel aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Stearinsäure (einfach negativ geladen) eingeschlossen, so denaturiert sie in zwei Übergängen bei $T_m(1)$ = 70,6°C und $T_m(2)$ = 72,5°C. Die Halbwertsbreiten betrugen $\Delta T_{1/2}(1)$ = 0,6°C und $\Delta T_{1/2}(2)$ = 1,2°C. Dies bedeutet, daß bei der Zumischung von 20% freier, negativ geladener Fettsäure die Stabilisierung des zusätzlichen Überganges von 3,5°C (reines Phosphatidylcholin) auf 1,9°C und die Verbreiterung von 1,5°C auf 0,6°C abfällt. Der ΔT_m - Wert ist in Abb. 38 Kap. 5.4 eingetragen.

Ein deutlich verändertes Denaturierungsverhalten zeigt die Nukleinsäure in Vesikeln aus Phosphatidylcholin - Phos-

phatidylserin - Mischungen. Als Beispiel eines Denaturierungsprofiles ist in Abb. 25 das der 179 bp DNA in Vesikeln aus 60% Phosphatidylcholin und 40% Phosphatidylserin abgebildet. Auffällig ist sowohl die erhebliche Stabilisierung

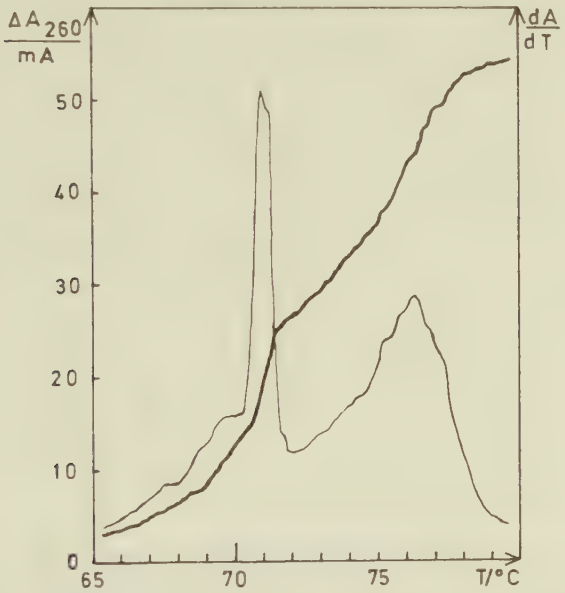

Abb. 25 Denaturierungsprofil (Meßkurve und erste Ableitung) von 179 bp DNA in Vesikeln aus 40% PS und 60% PC bei 10 mM NaCl in Standardpuffer.

des zweiten Überganges, die über der Stabilisierung, wie sie an reinen Phosphatidylcholinmembranen gemessen wurde (Kap. 4.2.3. Seite 55), liegt, als auch die starke Zunahme der Verbreiterung.

Die Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Zusammensetzung der Vesikel ist in Abb. 26a und b gezeigt; ebenso ist für den Bereich der Lipidmischungen (also den Molenbruchbereich zwischen 0,2 und 0,8) die Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung in Teil c der Abbildung dargestellt.

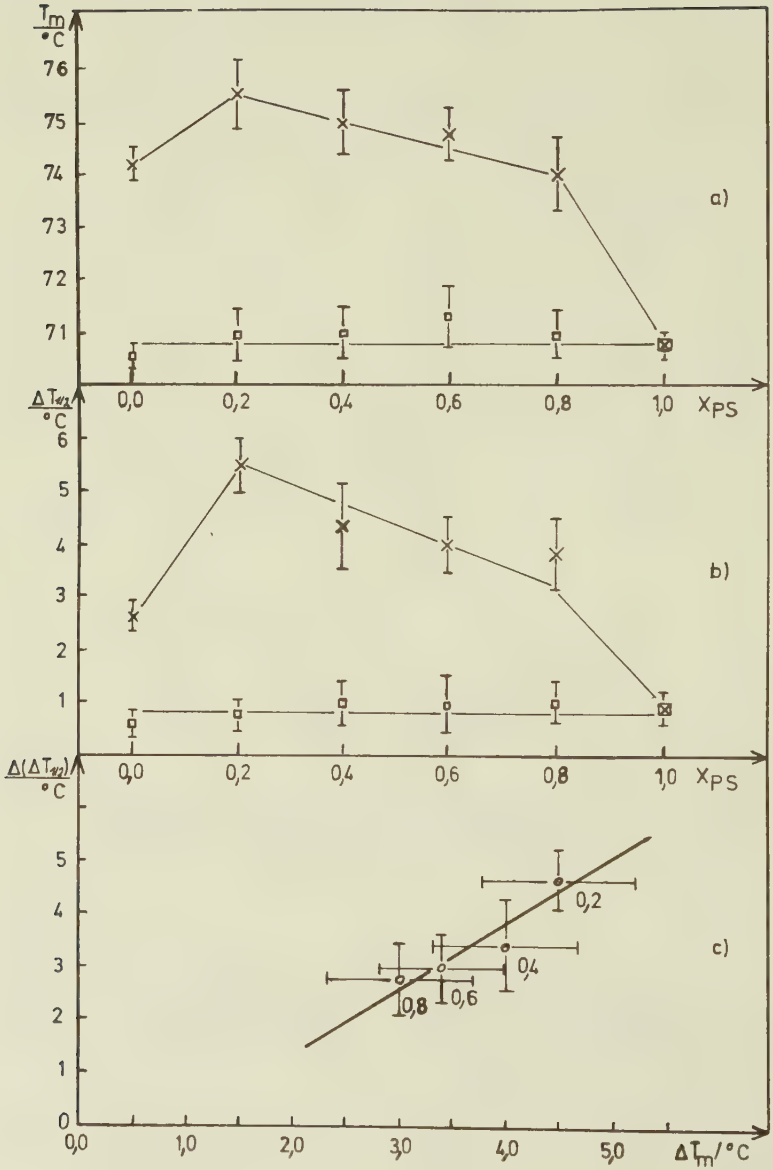

Abb. 26 Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Zusammensetzung der Membran, gemessen an 179 bp DNA in Vesikeln aus PC - PS - Mischungen (10 mM NaCl, Standardpuffer). a) T_m - Werte, b) $\Delta T_{1/2}$- Werte, c) Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung. x_{PS} = Molenbruch PS

Bei der Denaturierung der 179 bp DNA bei 10 mM NaCl in Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischvesikel blieb die Verteilung der Hypochromie auf die beiden Übergänge nicht konstant (wie in Kap. 4.2.3. bei der Ionenstärkeabhängigkeit der Denaturierung der 187 bp DNA beschrieben, vgl. Abb. 20), sondern veränderte sich mit der Zusammensetzung der Membran. In Abb. 27 ist der Anteil der Hypochromie des zusätzlichen Überganges an der Gesamthypochromie in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Membran dargestellt.

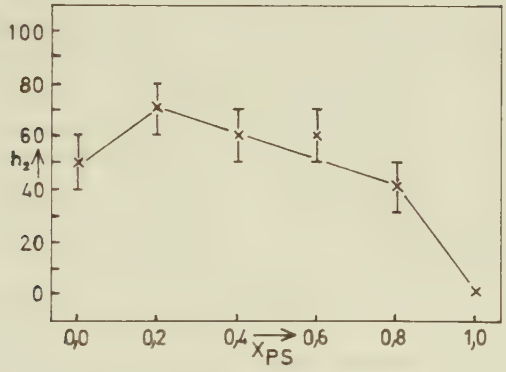

Abb. 27 Anteil der Hypochromie des zweiten Überganges an der Gesamthypochromie in % in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Membran, gemessen mit 179 bp DNA bei 10 mM NaCl (Standardpuffer). x_{PS} = Molenbruch PS in PC

Die absolut gemessenen Werte der gesamten Hypochromie schwankten sehr stark ($\pm$ 30%), so daß eine eindeutige Abhängigkeit der Hypochromie von der Zusammensetzung der Membran nicht angegeben werden kann. Die Werte lagen aber stets über dem Wert der in reinen Phosphatidylcholinvesikeln eingeschlossenen DNA.

Denaturierung von poly A·poly U

Bei den niedrigen Ionenstärken, wie sie notwendig sind, um die beiden Übergänge der eingeschlossenen Nukleinsäuren deutlich getrennt in einem gut handhabbaren Temperaturbereich messen zu können, ist die Denaturierung von Nukleinsäure irreversibel. Die so erhaltenen Ergebnisse lassen sich somit nicht mit den Methoden der klassischen Thermodynamik beschreiben (Kap. 3.2.1.). Wie in Abb. 22 aus Kap. 4.2.3. zu sehen ist, sind die beiden Übergänge von poly A·poly U in Phosphatidylcholinvesikeln auch bei 50 mM NaCl noch zu trennen. Bereits in Kap. 4.2.2. wurde beschrieben, daß bei dieser Ionenstärke beide Übergänge vollständig reversibel sind. Somit besteht an diesem System die Möglichkeit, die Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Zusammensetzung der Membran bei reversibler Denaturierung der Nukleinsäure zu messen. Hierzu wurde poly A·poly U bei 50 mM NaCl, in Standardpuffer gelöst, in Vesikel aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischungen eingeschlossen und die T_m - Werte und die Halbwertsbreiten der Übergänge bestimmt. In Abb. 28 sind die Ergebnisse dargestellt.

Sowohl bei der Denaturierung der 179 bp DNA als auch der poly A·poly U - Doppelstränge sind die beiden Übergänge bei $x_{PS} = 0{,}8$ nicht direkt auswertbar, da die Stabilisierung von vergleichbarer Größe ist wie die Verbreiterung. Die Übergänge müssen daher separiert werden. Dabei wurde nach der in Kap. 4.2.3. beschriebenen Methode verfahren. Da bei der Denaturierung von poly A·poly U bei 50 mM die Verteilung der Hypochromie auf die beiden Übergänge von der Zusammensetzung der Membran unabhängig ist und konstant bei 3:2 liegt, gilt zur Separation der Übergänge auch die zweite Voraussetzung aus Kap. 4.2.3. (Seite 60). Exemplarisch ist in Abb. 29 die Separation der Übergänge an poly A·poly U in Vesikeln aus 20% Phosphatidylcholin und 80% Phosphatidylserin durchgeführt.

Für die absolut gemessenen Werte der gesamten Hypochromie gilt das gleiche wie im vorigen Abschnitt zur 179 bp DNA Gesagte.

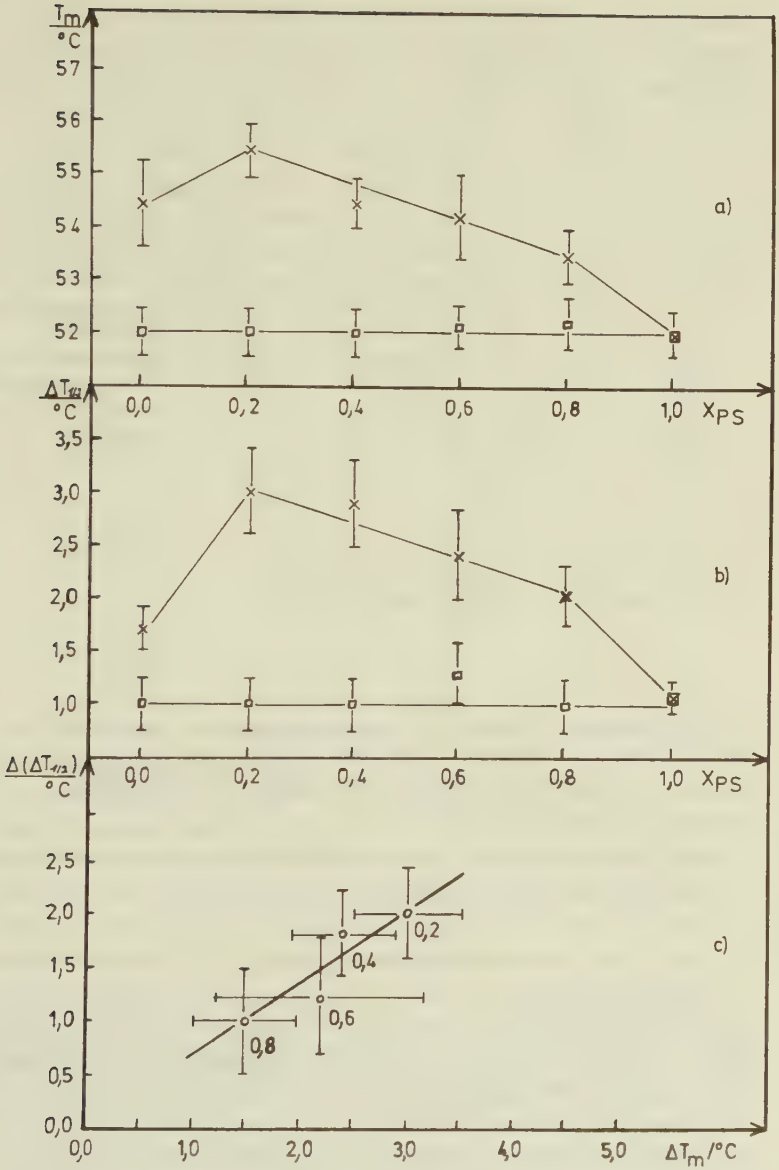

Abb. 28 Abhängigkeit der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte von der Zusammensetzung der Membran, gemessen an poly A·poly U in Vesikeln aus PC - PS - Mischungen (50 mM NaCl, Standardpuffer). a) T_m - Werte, b) $\Delta T_{1/2}$ - Werte, c) Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung.
x_{PS} = Molenbruch PS in PC

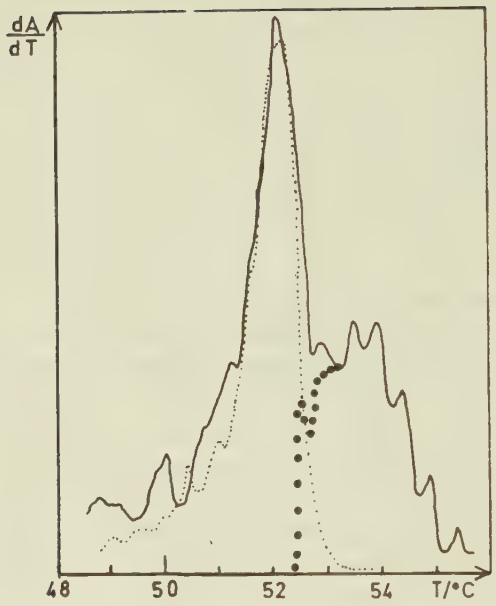

Abb. 29

Auflösung der Übergänge von poly A·poly U in Vesikeln aus 80% PS und 20% PC bei 50 mM NaCl in Standardpuffer.

——— Gemessenes Denaturierungsprofil

····· Gemessener Übergang frei gelöster RNA

• • • — Separierter zweiter Übergang

Im vorigen Abschnitt wurde beschrieben, daß sich die Verteilung der Hypochromie auf die beiden Übergänge bei 179 bp DNA bei 10 mM NaCl mit der Zusammensetzung der Membran verändert. An poly A·poly U bei 50 mM NaCl verteilt sich die Hypochromie unabhängig von der Zusammensetzung der Membran zu 60% auf den ersten und zu 40% auf den zweiten Übergang. Um zu entscheiden, ob dieser Unterschied auf die unterschiedlichen Nukleinsäuren oder auf die unterschiedlichen Ionenstärken zurückzuführen ist, wurde poly A·poly U bei 10 mM NaCl (Standardpuffer) in Vesikeln aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylserin eingeschlossen und thermisch denaturiert. Die Hypochromie verteilte sich in Übereinstimmung mit Abb. 27 zu 30% auf den ersten und zu 70% auf den zweiten Übergang. Daraus ist zu schließen, daß sich die Verteilung der Hypochromie auf die beiden Übergänge unabhängig von der Nukleinsäure bei niedriger Ionenstärke mit der Zusammensetzung der Membran verändert. Die gemessene Stabilisierung betrug 5,0°C, die Verbreiterung 3,0°C.

Weiterhin wurde poly A·poly U bei 50 mM NaCl (Standardpuffer) in Vesikel eingeschlossen, deren Membran durch negativ geladenes Phosphatidylglycerol verändert wurde. Da bei mehr als 50% Phosphatidylglycerol in Phosphatidylcholin Entmischung auftritt (vgl. Kap. 3.1.6.), wurde nur bei $x_{PG} = 0{,}2$, $x_{PG} = 0{,}4$ und in reinen Phosphatidylglycerolvesikeln ($x_{PG} = 1{,}0$) gemessen (vgl. Kap. 4.2.2.). Als Beispiel ist in Abb. 30 ein Denaturierungsprofil von poly A·poly U in Vesikeln aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylglycerol abgebildet.

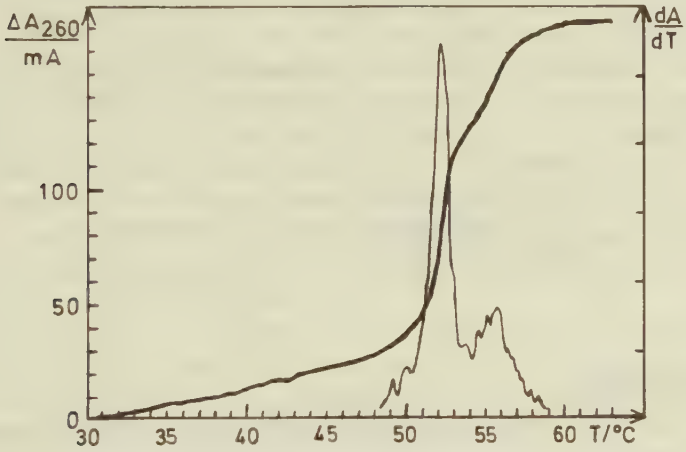

Abb. 30 Denaturierungsprofil (Meßkurve und erste Ableitung) von poly A·poly U in Vesikeln aus 80% PC und 20% PG bei 50 mM NaCl in Standardpuffer.

Die erhaltenen T_m - Werte sind in Abb. 31 in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Membran dargestellt. Sie stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit den Werten, wie sie an poly A·poly U in Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Vesikeln gemessen wurden (Abb. 28), überein. Auch in Phosphatidylcholin - Phosphatidylglycerol - Vesikeln verteilte sich bei 50 mM NaCl die Hypochromie konstant zu 60% auf den ersten und zu 40% auf den zweiten Übergang.

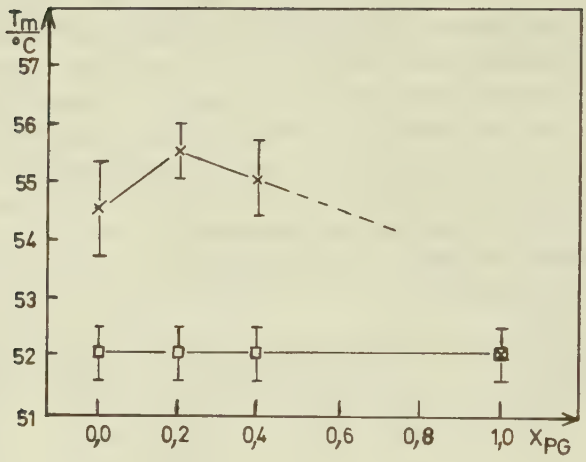

Abb. 31 Abhängigkeit des T_m - Wertes von der Zusammensetzung der Membran, gemessen an poly A·poly U in Vesikeln aus PC - PG - Mischungen (50 mM NaCl, Standardpuffer). x_{PG} = Molenbruch PG in PC.

Ergebnisse

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1) $T_m(1)$ und $\Delta T_{1/2}(1)$ sind von der Zusammensetzung der Vesikelmembran unabhängig und im Rahmen der Fehlergrenzen gleich den Werten frei gelöster Nukleinsäure.
2) Der Einfluß von negativ geladenen freien Fettsäuren in in der Membran auf $T_m(2)$ und $\Delta T_{1/2}(2)$ unterscheidet sich vom Einfluß der negativ geladenen Phospholipide. Mit der Zumischung freier Fettsäuren zu Phosphatidylcholin sinken Stabilisierung und Verbreiterung des zweiten Überganges.
3) Wird einfach negativ geladenes Phospholipid zu Phosphatidylcholin gemischt, so verhält sich die Nukleinsäure in Vesikeln aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischungen wie in Vesikeln aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylglycerol - Mischungen.

4) Das Hypochromieverhältnis der beiden Übergänge ist unabhängig von der verwendeten Nukleinsäure, bei reinen Phosphatidylcholinvesikeln unabhängig von der Ionenstärke und bei höheren Ionenstärken (50 mM NaCl) unabhängig von der Zusammensetzung der Vesikel. Bei niedrigen Ionenstärken (10 mM NaCl) ist es von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembran abhängig.

5) Durch 20% negativ geladenes Phospholipid erhöhen sich $T_m(2)$ und $\Delta T_{1/2}(2)$ relativ zu den Werten, die für Nukleinsäure in reinen Phosphatidylcholinvesikeln gemessen werden. Nukleinsäure, in Vesikel aus 20% negativ geladenem Phospholipid (PS oder PG) und 80% Phosphatidylcholin eingeschlossen, zeigt die größten überhaupt gemessenen Stabilisierungen und Verbreiterungen. Bei niedriger Ionenstärke (10 mM NaCl) existiert hier auch der größte Hypochromieanteil für den zweiten Übergang.

6) Wird mehr als 20% negativ geladenes Phospholipid zugesetzt, so sinken Stabilisierung und Verbreiterung und - bei niedrigen Ionenstärken - auch der Hypochromieanteil des zweiten Überganges langsam ab.

7) Nukleinsäure, in Vesikel aus reinem, negativ geladenen Phospholipid (Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Cardiolipin) eingeschlossen, denaturiert nur in dem einen Übergang der unbeeinflussten Nukleinsäure.

8) Bei der Denaturierung von Nukleinsäure in Vesikeln aus den gewählten Lipidmischungen sind Stabilisierung und Verbreiterung des zweiten Überganges positiv korreliert.

4.2.5. Einfluß von Cholesterol

Um den Einfluß von Cholesterol auf die Nukleinsäurepopulationen zu untersuchen, wurde poly A·poly U in Vesikel aus EPC und Cholesterol im Verhältnis 1:1 bei 10 mM und bei 50 mM NaCl (Standardpuffer) eingeschlossen und thermisch denaturiert. Die Denaturierungsprofile sind in Abb. 32 dargestellt. Man erkennt, daß mit wachsender Ionenstärke nicht nur die Stabilisierung (also der Abstand der T_m - Werte der beiden Übergänge) abnimmt, sondern auch die Halbwertsbreite des zweiten

Überganges. Die positive Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung bleibt also erhalten.

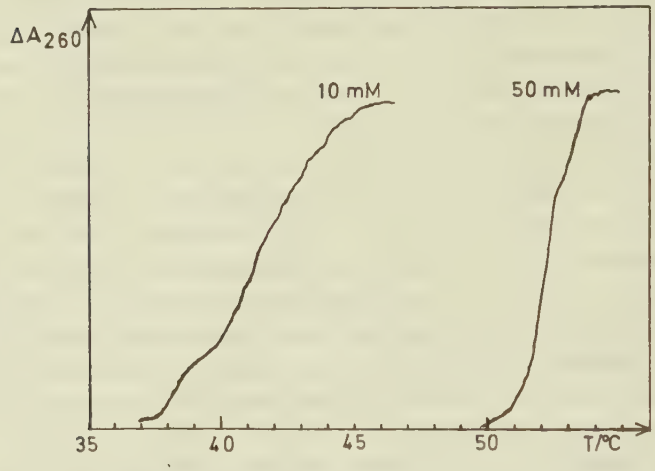

Abb. 32 Denaturierungsprofile von poly A·poly U in Vesikeln aus 50% PC und 50% Cholesterol bei 10 mM und 50 mM NaCl. Die Kurven sind auf gleiche Hypochromie normiert.

Deutlich ist auch zu sehen, daß sich bei 50 mM NaCl, wie auch in Kap. 4.2.4. beschrieben, die Hypochromie zu 60% auf den ersten und zu 40% auf den zweiten Übergang verteilt, während bei niedriger Ionenstärke, wie ebenfalls in Kap. 4.2.4. für Membranen aus Lipidmischungen beschrieben, sich die Hypochromieverteilung erheblich zugunsten des zweiten Überganges verschiebt. Dieser Effekt ist also nicht auf die Mischungen von Phospholipiden beschränkt, sondern tritt ebenfalls bei der Zumischung von Cholesterol zu Phosphatidylcholin auf. Die absolute Hypochromie der gesamten Nukleinsäure fiel um 50% beim Übergang von der niedrigen zur höheren Ionenstärke ab (vgl. Abb. 15 aus Kap. 4.1.4.).

Die $T_m(2)$ - Werte sind in Abb. 33 eingetragen. Man sieht, daß die T_m - Werte geringfügig gegenüber den T_m - Werten der Nukleinsäure in cholesterolfreien Vesikeln erniedrigt sind.

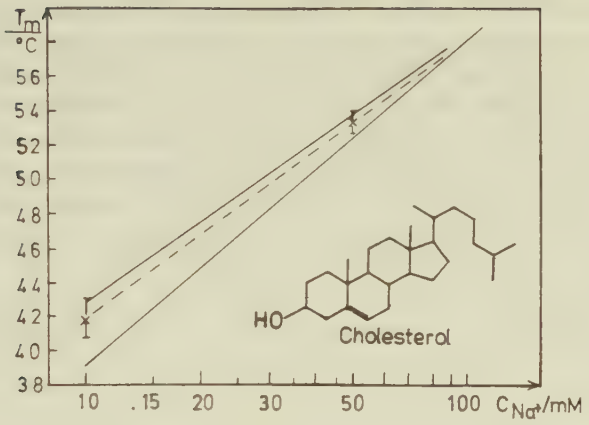

Abb. 33 Ionenstärkeabhängigkeit der T_m - Werte von poly A·poly U in Vesikeln aus EPC ———— (Vgl. Abb. 22a) und aus EPC - Cholesterol - Mischung im Verhältnis 1:1--X---

4.2.6. Variation der Fettsäurezusammensetzung

Einfluß der Nukleinsäure auf die Phasenübergänge des Lipids

Um sowohl den Einfluß der Lipidmembran auf die Nukleinsäure als auch den Einfluß der Nukleinsäure auf das Lipid zu untersuchen, wurde 187 bp DNA bei 10 mM NaCl (Standardpuffer) in Vesikel aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) eingeschlossen (vgl. Kap. 2.5.1.). Das Lipid zeigt zwei Phasenübergänge erster Ordnung (51) bei 32°C und 41°C, wie bereits in den Kap. 3.1.5. und.3.1.7. dargestellt wurde. Zur Bestimmung der Übergangstemperaturen unter dem Einfluß der Nukleinsäure wurden vier Messungen durchgeführt. Sie sind in Abb. 34b im Bereich zwischen 26°C und 38°C aufgezeichnet. Bei der verwendeten Lipidkonzentration können feste DPPC - Vesikel sedimentieren und dabei zufällige Schwankungen der Extinktion hervorrufen. Um diesen Effekt mit Sicherheit ausschließen zu können, wurde eine der Proben (oberste Meß-

reihe in Abb. 34b) um den Faktor zehn verdünnt (105). Daher war die Extinktionsänderung der eingeschlossenen Nukleinsäure bei dieser Messung nicht mehr auswertbar. Die übrigen Meßkurven waren von 38°C an reproduzierbar, so daß für diesen Temperaturbereich nur eine Meßkurve angegeben ist. Insgesamt läßt sich feststellen, daß der Hauptübergang des DPPC nicht durch den Nukleinsäureeinschluß verändert wurde, und daß der Vorübergang bei Einschluß der Nukleinsäure nicht mehr definiert meßbar war.

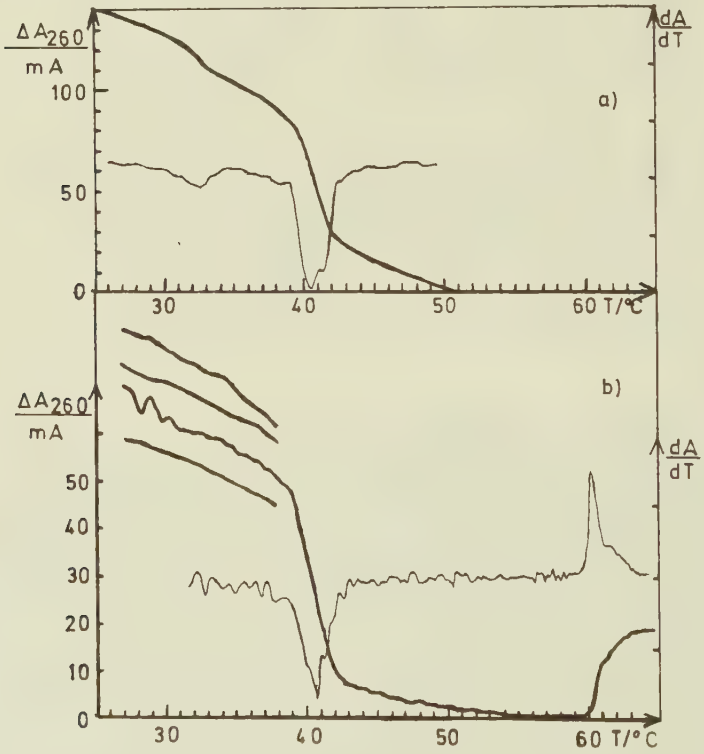

Abb. 34 Extinktion von DPPC - Vesikeln in Standardpuffer bei 10 mM NaCl in Abhängigkeit von der Temperatur a) ohne Nukleinsäureeinschluß, b) mit eingeschlossener 187 bp DNA. Bezüglich des Vorüberganges sind alle vier gemessenen Kurven eingetragen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Einfluß der Fettsäurezusammensetzung der Membran auf die Helix - Knäuel - Übergänge der Nukleinsäure

Wie in Kap. 3.1.3. ausgeführt, ist der Abstand der Phosphatidylcholinkopfgruppen in der Membran von der Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylcholins abhängig. Insbesondere wächst dieser Abstand, wenn Doppelbindungen in die Fettsäuren eingeführt werden. Daher wurde die 187 bp DNA bei 10 mM NaCl (Standardpuffer) nicht nur in Vesikel aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, zwei gesättigte Fettsäuren), sondern auch in Vesikel aus Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC, zwei einfach ungesättigte Fettsäuren) eingeschlossen und thermisch denaturiert. Sowohl in DPPC - als auch auch in DOPC - Vesikeln denaturiert die DNA in zwei Übergängen. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Lipid	Messung	$T_m(2)$/°C	ΔT_m/°C
DPPC	a	61,7	1,7
	b	61,2	1,2
	c	61,5	1,5
DOPC	d	62,8	2,8
	e	62,0	2,0
	f	63,5	3,5

Tab. 5 $T_m(2)$ - Werte und Stabilisierung ΔT_m der 187 bp DNA in Vesikeln aus DPPC und DOPC bei 10 mM NaCl in Standardpuffer. $T_m(1)$ betrug bei allen Messungen (60,0 ± 0,2)°C.

Damit beträgt die mittlere Stabilisierung der 187 bp DNA bei 10 mM NaCl unter dem Einfluß einer DPPC - Membran ΔT_m = 1,5°C ± 0,3°C und unter dem Einfluß einer DOPC - Membran ΔT_m = 2,8°C ± 0,8°C. Als Beispiel sind die Meß-

kurven zu den Messungen a) und d) aus Tab. 5 in Abb. 35 abgebildet.

Die $\Delta T_{1/2}$ - Werte des zweiten Überganges lagen bei den sechs gemessenen Denaturierungsprofilen alle zwischen 1°C und 2°C.

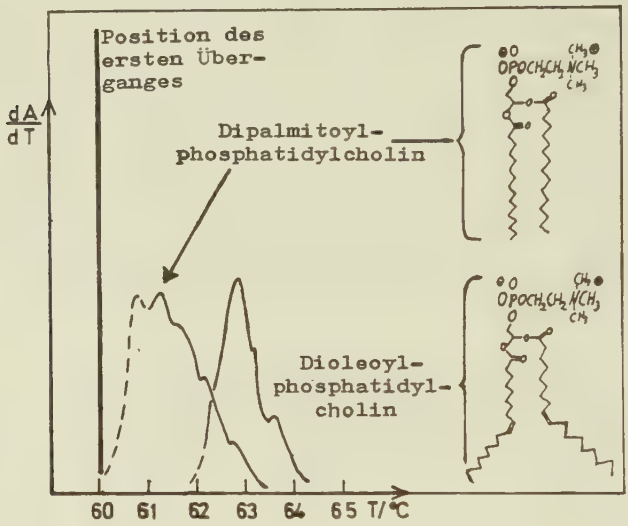

Abb. 35 Zweiter Übergang der 187 bp DNA bei 10 mM NaCl (Standardpuffer) in Vesikeln aus DPPC und DOPC. Vom Gesamtdenaturierungsprofil wurde der Übergang frei gelöster DNA subtrahiert, so daß nur der zweite Übergang dargestellt ist (vgl. Abb. 23 und Abb. 29). Die berechneten Kurventeile sind unterbrochen gezeichnet.

5. Diskussion

5.1. Zur Methode

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkung von Nukleinsäure mit Lipidmembranen. Methodisch wurde so vorgegangen, daß definierte Nukleinsäuren in Lipidvesikel eingeschlossen und anschließend thermisch denaturiert wurden. Das so erhaltene Denaturierungsprofil wurde mit dem Denaturierungsprofil frei gelöster Nukleinsäure verglichen.

Hierbei ergaben sich mehrere Probleme. So mußten große Mengen Nukleinsäure in die Vesikel eingeschlossen werden, um ein meßbares und auswertbares Signal bei der Denaturierung zu erhalten. Maximale Einschlüsse sind nur mit dem Vesikeltyp der REV zu erhalten (43). Wie in Kap. 4.1.4. dargelegt, schieden SUV aus, da sich in ihnen keine Nukleinsäure einschliessen ließ. Literaturangaben zufolge sind die Einschlüsse in MLV deutlich geringer als in REV (25), so daß nicht nur aufgrund des hohen Lipidanteiles ein stärkeres Rauschen, sondern auch absolut ein geringeres Signal zu erwarten wäre. Darüberhinaus ist zur Charakterisierung der MLV außer der Kenntnis der Größenverteilung noch die der Verteilung über die Zahl der Bilayer notwendig, da Vesikel gleichen Durchmessers aus unterschiedlich vielen Bilayern aufgebaut sein können (43). Das System ist daher weitaus schwieriger zu definieren. Für REV wird hingegen Unilamellarität in der Literatur berichtet; lediglich ein geringer Anteil der Vesikel ist oligolamellar (25). LUV lassen sich entweder nur mit negativ geladenem Lipid herstellen (Fusionstechnik (106)) oder nur bei hohen Temperaturen (65°C), die oft über dem T_m - Wert der verwendeten Nukleinsäure liegen (Injektionstechnik (107)), oder benötigen große wässrige Volumina für den Einschluß (Dialysetechnik (108,109)). GUV waren bei Beginn dieser Arbeit noch unbekannt (36).

Aufgrund der besonderen Präparationstechnik (25) lassen sich in REV große Substanzmengen einschliessen. Aber auch bei diesem Vesikeltyp war es notwendig, mit Lösungen hoher

Nukleinsäurekonzentration zu arbeiten, um gut meßbare Signale zu erhalten. Die günstigsten Ergebnisse wurden mit Konzentrationen von 20 bis 25 A_{260}/ml erhalten. Um den Verbrauch der wertvollen DNA - Fragmente so gering wie möglich zu halten, mußte das Volumen der Vesikelpräparation minimiert werden. Als Optimum erwies sich ein Volumen von 100 µl.

Eine Fraktionierung der Vesikel nach Größe durch Säulenchromatographie über Sephacryl S - 1000, wie in der Literatur beschrieben (101), brachte nicht die gewünschten Ergebnisse. Die Chromatogramme bestätigten zwar qualitativ die Größenverteilung, wie sie aus der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen gewonnen wurde, aber es war nicht möglich, in präparativem Maßstab zu arbeiten.

Ein weiteres Problem ergab sich bei der Denaturierung aus der Trübung der Lösung infolge der Lichtstreuung an den Vesikeln. Bei Temperaturerhöhung ist daher der Extinktionserhöhung der Nukleinsäure bei der Denaturierung eine Extinktionsverringerung durch Änderung der Lichtstreuung an den Vesikeln überlagert. Durch Messung der Extinktion bei zwei verschiedenen Wellenlängen und durch Messung der Extinktion unbeladener Vesikel liessen sich beide Effekte separieren und die Extinktion der Nukleinsäure alleine bestimmen.

Eine Fehlerabschätzung für die T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte der eingeschlossenen Nukleinsäure wurde bereits in Kap. 4.2.1. gegeben. Insbesondere ist zwischen dem Fehler bei der Einzelmessung des T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Wertes und der Reproduzierbarkeit dieser Werte zu unterscheiden. Eine quantitative Fehlerrechnung ist nicht möglich, da für Aussagen zur Statistik zu wenig Messungen wiederholt werden konnten und die verwendete DNA zu wertvoll zu einer reinen Erhöhung der Statistik ist. Lediglich an einigen ausgewählten Systemen wurden Messungen mehrmals wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Werte zu überprüfen: 179 bp DNA in EPC - Vesikeln, 187 bp DNA in DPPC - und DOPC - Vesikeln bei 10 mM NaCl (jeweils drei Messungen), 179 bp DNA in Vesikel aus reinem PS und einer Mischung aus 60% PC und 40% PS bei 10 mM NaCl

und poly A·poly U in PC - PS - und PC - PG - Mischvesikeln und reinen PS - und PG - Vesikeln bei 50 mM NaCl (jeweils zwei Messungen). Insgesamt läßt sich sagen, daß zwar durch den Einschluß der Nukleinsäure in Liposomen größere Fehler in T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werten verursacht werden als bei der Messung an frei gelöster Nukleinsäure, daß aber die gemessenen Effekte weit außerhalb der Fehlerbereiche liegen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, daß der Einfluß der Lipidmembran sowohl an DNA - Stücken als auch an poly A·poly U in gleicher Weise sichtbar ist, wie aus den Messungen zur Ionenstärkeabhängigkeit (Abb. 21 und Abb. 22 in Kap. 4.2.3.) und der Lipidabhängigkeit (Abb. 26 und Abb. 28 in Kap. 4.2.4.) der T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte hervorgeht.

Die methodische Bedeutung dieser Untersuchungen liegt darin, daß es erstmals möglich war, optische Messungen an trüben Nukleinsäure - Lipid - Systemen durchzuführen. Untersuchungen dieser Art wurden bisher nur an Systemen durchgeführt, bei welchen artifiziell Bedingungen geschaffen wurden, unter denen sich keine Membranen ausbilden konnten, so daß die einzelnen Lipidmoleküle als Liganden an die Nukleinsäuremoleküle gebunden waren. Außerdem wurden bisher keine definierten Nukleinsäurestücke verwendet, sondern lediglich gescherte chromosomale DNA (12,13,110). Erst durch die methodische Entwicklung, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wird, war es möglich, die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und Lipiden auf deren polare Kopfgruppen zu beschränken und somit die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und geschlossenen Membranen zu untersuchen.

5.2. Die Organisation der Nukleinsäuren im Vesikel

Wie in Kap. 4.2.2. gezeigt, existiert die Nukleinsäure nach dem Einschluß in phosphatidylcholinhaltige Vesikel in zwei verschiedenen Populationen. Die eine verhält sich wie freie, unbeeinflußte Nukleinsäure, während die zweite ein davon abweichendes Verhalten zeigt, das somit auf den Einfluß der Membran zurückgeführt werden muß. Da beide Populationen vor Nukleaseangriff geschützt sind, und zwar im nativen wie im denaturierten Zustand, wie aus der Re-

versibilität der Denaturierung beider Populationen hervorgeht, muß davon ausgegangen werden, daß beide Populationen im Inneren der Vesikel vorliegen (vgl. auch Kap. 4.1.5.). Außerdem läßt sich sagen, daß die Lipide die Renaturierung von Einzelsträngen sterisch nicht behindern.

Das experimentelle Ergebnis, daß der zusätzliche Übergang stets bei höherer Temperatur erfolgt als der Übergang frei gelöster Nukleinsäure ($\Delta T_m > 0$), besagt, daß die Doppelstränge gegenüber den Einzelsträngen unter dem Einfluß der Membran stabilisiert werden. Die Erhöhung der Ionenstärke (Kap. 4.2.3.) ergibt eine abnehmende Stabilisierung und damit eine Abnahme der Stärke der Wechselwirkung. Wie in den Kap. 3.1.4. und 3.2.2. ausgeführt, verringern sich die Reichweiten der elektrostatischen Potentiale von Membran und Nukleinsäure mit zunehmender Ionenstärke, so daß die hier gemessene Ionenstärkeabhängigkeit der Stabilisierung einen unmittelbaren Hinweis auf den wesentlich elektrostatischen Charakter der Wechselwirkung darstellt (111). Da die elektrostatischen Potentiale mit 1 nm bis 3 nm geringe Reichweiten relativ zur Ausdehnung der Liposomen besitzen (180 nm Durchmesser), bedeutet dies, daß die Nukleinsäurepopulation, die mit der Membran wechselwirkt, in unmittelbarer Nähe der Membran lokalisiert sein muß, während die unbeeinflusste Nukleinsäurepopulation den größten Teil des Vesikelvolumens einnehmen kann, wo die Felder der Membran nicht mehr wirken. Hierbei sind noch, wie in Abb. 2 in Kap. 1.1. angedeutet, die Möglichkeiten zu diskutieren, daß die Nukleinsäure die Membran penetriert oder auf der Membran adsorbiert ist. Bei einer Penetration der Membran durch die Nukleinsäure müßte dieselbe als "Verunreinigung" wirken und den Phasenübergang des Lipids verändern. Im Falle der Vesikel aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) wurde die Phasenumwandlungstemperatur T_{c2} des Hauptüberganges (Kap. 3.1.5.) gemessen. Wie in Abb. 34 (Kap. 4.2.6.) zu sehen, wird der Hauptübergang des Lipids aber durch Nukleinsäureeinschluß in die Vesikel nicht verändert. Eine Penetration der Membran durch Nukleinsäure kann daher ausgeschlossen werden. Für eine Adsorption spricht hingegen, daß der Vorübergang des DPPC, der sich als Veränderung der

Oberfläche der Membran charakterisieren läßt (Kap. 3.1.5.), durch den Nukleinsäureeinschluß beeinflußt wird, wie in Abb. 34 zu sehen. Bei Reichweiten der elektrostatischen Potentiale von 3 nm bis 1 nm bei Ionenstärken zwischen 10 mM und 100 mM NaCl folgt, daß die adsorbierte Nukleinsäure sich in Abständen entsprechender Größenordnung von der Membran entfernt aufhält. Da die elektrostatischen Potentiale von Nukleinsäure und Membran zwangsläufig gleiche Reichweiten haben (112 - 114), muß man von einer gegenseitigen Beeinflussung sprechen, d.h. die Lipidmoleküle stehen unter dem Einfluß der Nukleinsäure, wenn die Nukleinsäure unter dem Einfluß der Membran steht (siehe Kap. 5.4.).

Die Existenz von zwei getrennten Helix - Knäuel - Übergängen für die beiden Nukleinsäurepopulationen läßt Aussagen über die Austauschgeschwindigkeiten zwischen den beiden Populationen zu.

Die frei gelöste Nukleinsäure denaturiert voll kooperativ, d.h. die nach Gl. 4 berechnete van't Hoff'sche Enthalpie ist mit der gesamten Enthalpie der Denaturierung identisch (vgl. Kap. 3.2.1.). Da der erste Übergang der eingeschlossenen Nukleinsäure die gleiche T_m- und $\Delta T_{1/2}$ - Werte wie die frei gelöste Nukleinsäure hat und damit auch die gleiche Enthalpie, bedeutet dies, daß das gesamte Molekül kooperativ denaturiert und während der Denaturierung nicht mit der Membran in Kontakt kommt. Der Zeitbedarf für den Austausch beider Nukleinsäurepopulationen kann daher nicht dem Zeitbedarf für die Denaturierung der Nukleinsäure vergleichbar sein, sondern muß entweder deutlich kleiner oder deutlich größer sein. Im Falle des schnellen Austausches sind zwei Modelle zu diskutieren, die beide zu falschen Aussagen führen und daher auf das System nicht anwendbar sind. So wäre denkbar, daß nur native Moleküle austauschen, Einzelstränge aber nicht mit der Membran assoziiert sind. Wäre die Verweildauer eines nativen Moleküls auf der Membran geringer als der Zeitbedarf für die thermische Denaturierung der beiden Nukleinsäurepopulationen, so müßten die gebundenen Doppelstränge während der Denaturierung der unbeeinflußten Nukleinsäure von der Membran dissoziieren, um dann selbst zu denaturieren. Ein zweiter Helix - Knäuel - Übergang wäre nicht meßbar, dafür der erste stabili-

siert. Für den zweiten Fall, daß nämlich sowohl Doppelstränge als auch Einzelstränge im schnellen Austausch stehen, läßt sich nur das in Abb. 36 dargestellte Modell aufstellen, das - wie ausgeführt werden soll - im Gleichgewicht nicht möglich ist.

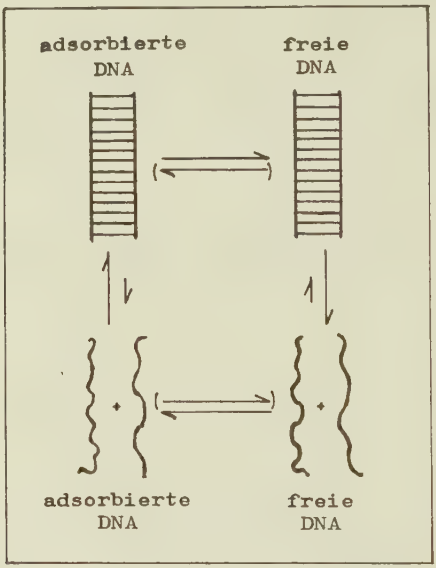

Abb. 36 Modell der DNA - Denaturierung bei schnellem Austausch adsorbierter und freier DNA. Das Modell widerspricht thermodynamischen Grundregeln und kann daher das Verhalten der Nukleinsäure im Vesikel nicht beschreiben (siehe Text).

Abb. 36 zeigt ein System mit schnellem Nukleinsäureaustausch bei einer Temperatur zwischen den beiden Übergängen, so daß unbeeinflußte DNA nur in einzelsträngiger, gebundene DNA nur in doppelsträngiger Form vorliegt (die Gleichgewichte sind vollständig auf eine Seite verschoben, wie mit den durchgezeichneten Pfeilen angegeben). In einem solchen Zustand muß bei schnellem Nukleinsäureaustausch einzel-

strängige DNA auf der Membran binden und notwendigerweise renaturieren, während doppelsträngige DNA von der Membran dissoziiert und anschließend denaturiert (auch diese Gleichgewichte sind also vollständig auf eine Seite verschoben, wie durch die nicht eingeklammerten Pfeile angegeben). Man erhält ein zyklisches, fließendes System, ohne daß die einzelnen Teilschritte reversibel sind. Dies widerspricht der onsagerschen Aussage zum detaillierten Gleichgewicht; ein solcher Prozess ist energetisch unmöglich (115).

Insgesamt muß der Austausch der Nukleinsäurepopulationen somit mehr Zeit benötigen, als in einem Experiment während der Denaturierung beider Nukleinsäurepopulationen zur Verfügung steht (ca. 0,5 h). Dies bedeutet, daß zur Bindung der Nukleinsäure an Membranen eine hohe Aktivierungsenergie zu überwinden ist. Die große Bedeutung der Aktivierungsenergie für alle Wechselwirkungen ausgedehnter Aggregate mit Lipidkopfgruppen wird auch in der Literatur hervorgehoben (54,59,68).

Weitere Informationen zur Organisation der Nukleinsäure im Vesikel erhält man durch Kombination von Ergebnissen aus Kap. 4.1.4. und Kap. 4.2.3.. Wie in Kap. 4.1.4. bestimmt, enthält ein Vesikel mit dem volumengemittelten Radius von 90 nm bei einer Ionenstärke von 10 mM NaCl etwa 50 Nukleinsäuremoleküle. Da der Hypochromieanteil des Überganges adsorbierter Nukleinsäure an Phosphatidylcholinmembranen stets 40% der Gesamthypochromie beträgt, bedeutet dies, daß von den 50 Molekülen 30 im inneren Hohlraum des Vesikels gelöst und 20 auf der inneren Oberfläche der Membran adsorbiert sind. Berechnet man den mittleren Abstand zweier unbeeinflußter Moleküle und den mittleren Abstand zweier auf der Membran adsorbierter Moleküle, so erhält man für beide den gleichen Wert von ungefähr 60 nm. Wie in Tab. 3 aus Kap. 3.2.3. aufgeführt, entspricht dieser Wert auch der Länge eines DNA - Moleküls. Möglicherweise verteilen sich die DNA - Moleküle zwischen freiem Volumen und zur Verfügung stehender Oberfläche gerade so, daß ihr Abstand maximal wird.

Wie in Abb. 37 schematisch dargestellt, wechselwirkt ein adsorbiertes DNA - Molekül auf der Membran näherungsweise

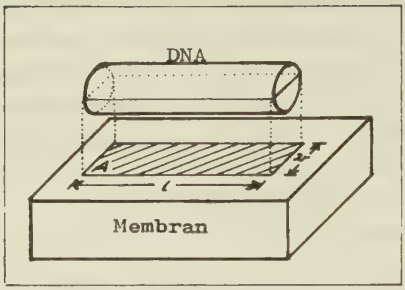

Abb. 37

Schema zum räumlichen Ausmaß der Wechselwirkung. Die Länge des DNA - Moleküls entspricht nicht dem verwendeten Maßstab. Erläuterungen siehe Text.

über seine Längsschnittfläche $A = 2rl = 165\ nm^2$ (Daten nach Tab. 3, Kap. 3.2.3.). Bei einem Platzbedarf von $0{,}65\ nm^2$ für den Platzbedarf einer Phosphatidylcholinkopfgruppe (99) bedeutet dies, daß ein DNA - Molekül von 187 bp mit 250 Lipidmolekülen wechselwirkt. Mit den Zahlen aus Kap. 4.1.1. folgt, daß alle adsorbierten DNA - Moleküle etwa 3% aller Lipidmoleküle des inneren Monolayers beeinflussen.

5.3. Konzentrationseffekte

Da die Reassoziation zweier DNA - Einzelstränge zu einer Doppelhelix eine Reaktion zweiter Ordnung und damit konzentrationsabhängig ist, muß der mögliche Einfluß der hohen effektiven Nukleinsäurekonzentration im Vesikel auf das Denaturierungsverhalten der Nukleinsäure abgeschätzt werden. An anderen Nukleinsäuren konnte die Abhängigkeit des T_m - Wertes von der Konzentration experimentell bestimmt werden (83). Zur Abschätzung der zu erwartenden Abhängigkeit wird im folgenden eine Maximalabschätzung vorgenommen. Wie aus Abb. 21a zu entnehmen ist, denaturiert die 187 bp DNA bei 30 mM NaCl in Standardpuffer bei 341 K. Die Denaturierung bei 30 mM NaCl ist reversibel (Kap. 4.2.2.). Setzt man für $\Delta T_{1/2} = 0{,}8$ K (gemessen: 0,6 K $\pm$ 0,2 K), so gilt für $\Delta H_V \approx 7300$ kJ/mol (Gl. 4, Kap. 3.2.1.). Diese Werte wurden an einer Probe der Konzentration

c_1 = 0,1 A_{260}/ml gemessen. Setzt man für die Konzentration der DNA im Vesikel den Wert c_2 = 100 A_{260}/ml (gemessen bei 10 mM NaCl: (80 ± 20) A_{260}/ml, Kap. 4.1.4.), so ergibt sich nach (83) mit Gl. 10 eine maximal zu erwartende Stabilisierung von ΔT_m = 1°C.

$$\Delta T_m = \frac{R \cdot \ln c_2/c_1}{\Delta H_v} \cdot T_m^2 \qquad \text{Gl. 10}$$

Die gemessenen Stabilisierungen waren jedoch unterhalb 50 mM NaCl deutlich größer als 1°C und können daher nicht als reiner Konzentrationseffekt interpretiert werden. Außerdem gilt diese Überlegung ohnehin nur dann, wenn die Renaturierung als Prozess zweiter Ordnung zum Gleichgewicht beiträgt, also bei reversibler Denaturierung der Nukleinsäure. Die Stabilisierung der Nukleinsäure steigt jedoch mit abnehmender Ionenstärke an und ist damit im Bereich irreversibler Denaturierung noch größer.

Auch läßt sich mit diesem Ansatz nicht das Auftreten zweier Übergänge erklären. Insgesamt muß daher festgestellt werden, daß die Konzentrationsabhängigkeit des T_m - Wertes für die gemessenen Effekte nicht nur nicht verantwortlich ist, sondern gar nicht nachweisbar war.

Daß diese Konzentrationseffekte bei reversibler Prozessführung (also bei Ionenstärken von 30 mM NaCl an) im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht gemessen wurde, hat mehrere Ursachen. So wurde eine Konzentration von 80 A_{260}/ml lediglich in Vesikeln bei 10 mM NaCl bestimmt. Aus der Ionenstärkeabhängigkeit des Nukleinsäureeinschlusses (Abb. 15, Kap. 4.1.4.) folgt aber, daß sich der Einschluß beim Übergang von 10 mM NaCl auf 30 mM NaCl um die Hälfte verringert, also auf 40 A_{260}/ml. Wie in Kap. 5.2. ausgeführt, reduziert sich die effektive Konzentration der Nukleinsäure durch partielle Adsorption auf der Membranoberfläche um weitere 40%, so daß eine Konzentration von lediglich 25 A_{260}/ml übrigbleibt. Rechnet man noch mit einem Mittelwert von 0,6 K für $\Delta T_{1/2}$ in Gl. 4, so ergibt sich aus Gl. 10 eine Stabilisierung von lediglich 0,5°C. Im Rahmen der Meßgenauigkeiten lassen sich Effekte dieser Größe nicht mehr nachweisen.

5.4. Ein Modell der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran

Wie bereits in Kap. 5.2. erwähnt, bedeutet die Stabilisierung der zweiten Nukleinsäurepopulation, daß die Membran doppelsträngige Nukleinsäure gegenüber einzelsträngiger stabilisiert.

Über die unterschiedliche Bindungsstärke von Doppelsträngen gegenüber Einzelsträngen an Membranen wurde auch in der Literatur berichtet. Eine Arbeit von H.Joenje et al. aus dem Jahre 1974 beschreibt unter anderem die Bindung von Nukleinsäure an Vesikel, die aus B. subtilis - Membranen präpariert wurden. Es wird berichtet, daß die Membran 30% weniger Nukleinsäure in Einzelstrangform als in Doppelstrangform bindet (116). Allerdings wurde nicht zwischen dem Einfluß der Proteine und dem Einfluß der Lipide unterschieden, wodurch die Übertragung dieses Wertes auf die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse fragwürdig ist. Da es sich derzeit aber um die einzige Angabe handelt, die unter Umständen eine grobe Abschätzung der Größe des beschriebenen Effektes erlaubt, ist sie in diesem Zusammenhang von Bedeutung.

Das Aufstellen eines Modells der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Lipidmembran bedeutet, die Abhängigkeit des $T_m(2)$ - Wertes der adsorbierten Nukleinsäure von der Zusammensetzung der Membran, wie sie in Abb. 26a, 28a, 31 und 38 dargestellt ist, zu erklären. Während sich die Abnahme der Stabilisierung der Nukleinsäure bei der Einlagerung negativ geladener, freier Fettsäuren (Stearinsäure) in die Membran (Kap. 4.2.4., Seite 62) als "relative Destabilisierung" unter dem Einfluß eines verringerten positiven Potentials (Kap. 3.1.4.) erklären läßt, ist der Einfluß der negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol auf die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran deutlich vom Einfluß der negativ geladenen freien Fettsäuren verschieden. Zur Erklärung der drastischen Zunahme der Stabilisierung beim Übergang von 0% auf 20% negativ geladene Phospholipidmoleküle (Abb. 26a bzw. 39) ist eine eingehendere Betrachtung des Systems nötig.

In Abb. 38 ist die Stabilisierung ΔT_m der 179 bp DNA in Vesikeln in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmembran dargestellt (aus Abb. 26a). Die gleiche Form der Abhängigkeit wurde auch für poly A·poly U gefunden (vgl. Abb. 28a und 31), so daß Abb. 38 exemplarisch diskutiert werden soll.

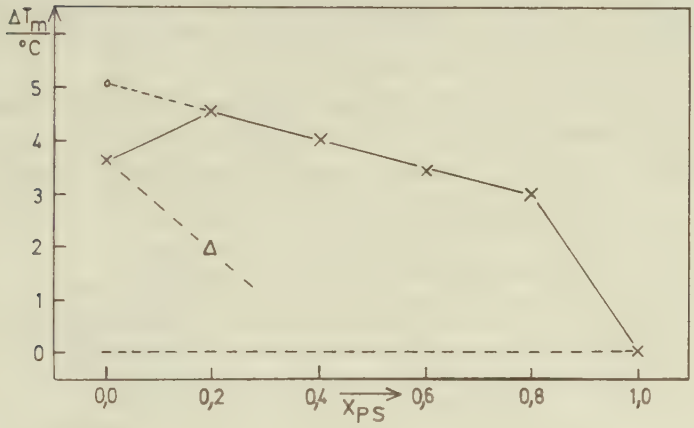

Abb. 38 Abhängigkeit der Stabilisierung ΔT_m (179 bp DNA, 10 mM NaCl, Standardpuffer) von der Zusammensetzung der Membran (vgl. Abb. 26a).
x_{PS} = Molenbruch PS in PC. Eingetragen ist weiterhin die Stabilisierung der 179 bp DNA in Vesikeln aus 80% PC und 20% Stearinsäure (Δ)(vgl. Seite 62).
Erläuterungen siehe Text.

Wie zu sehen ist, existiert keine Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und reiner Phosphatidylserinmembran (ΔT_m = 0 für x_{PS} = 1,0) (siehe Abb. 40a). Daher kann eine Wechselwirkung zwischen Phosphatidylserin und Nukleinsäure auch nicht für die Zunahme der Stabilisierung der Nukleinsäure beim Übergang von 0% zu 20% Phosphatidylserin verantwortlich

sein. Im Falle einer reinen Phosphatidylcholinmembran existiert bereits eine Wechselwirkung zwischen der Lipidmembran und der Nukleinsäure ($\Delta T_m > 0$ für $x_{PS} = 0,0$). Phosphatidylserin kann das Verhalten der Nukleinsäure somit nur beeinflussen durch eine Veränderung der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Phosphatidylcholin. Eine solche Veränderung der Wechselwirkung zwischen Phosphatidylcholin und Nukleinsäure wird - wie im folgenden ausgeführt werden soll - bereits durch eine Veränderung der Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle miteinander erzielt, also durch eine Veränderung, die nur auf die Membran beschränkt ist. Wie in Abb. 39 veranschaulicht und in Kap. 3.1.3. beschrieben ist, beeinflussen sich Phosphatidylcholinmoleküle im geschlossenen Membranverband gegenseitig durch eine starke Dipol - Dipol - Wechselwirkung. Eine elektrostatische

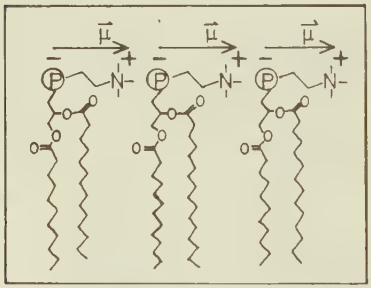

Abb. 39 Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinkopfgruppen in der Membran.
$\vec{\mu}$ = Dipolmoment

Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Phosphatidylcholin ist lediglich als Dipol - Monopol - Wechselwirkung zwischen der elektrisch negativ geladenen Nukleinsäure und der dipolaren Kopfgruppe des Phosphatidylcholins möglich. Es besteht also eine Konkurrenz zwischen der Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle miteinander in der Membran und der Dipol - Monopol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle mit der Nukleinsäure senkrecht zur Membran. Dies ist gleichbedeutend mit der Annahme einer Konformationsänderung der Phosphatidylcholinkopfgruppen im Falle der Wechselwirkung mit der Nukleinsäure. Diese Situation ist in Abb. 40c dargestellt.

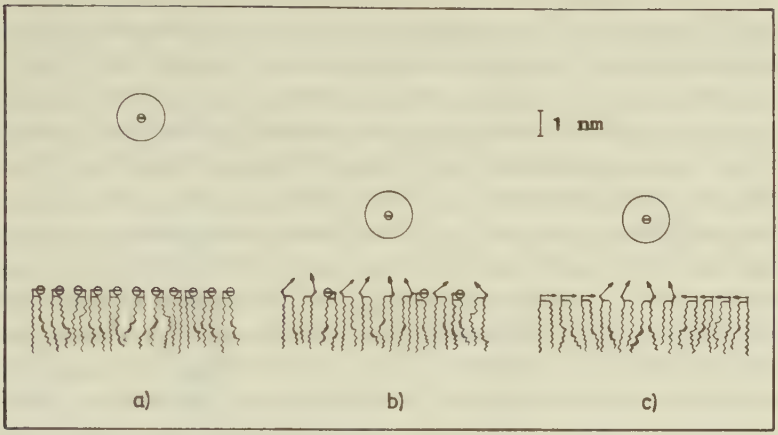

Abb. 40 Ein Modell zur Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure (im Querschnitt als Kreis dargestellt) und einer
a) Phosphatidylserinmembran,
b) Phosphatidylserin - Phosphatidylcholin - Mischmembran,
c) Phosphatidylcholinmembran.
Der größere Abstand zwischen der Nukleinsäure und der Phosphatidylserinmembran soll veranschaulichen, daß eine Adsorption nicht stattfindet.

Da bei der Denaturierung der adsorbierten Nukleinsäure die Energie der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und der Membran abnimmt (Kap. 5.2.), mithin also Phosphatidylcholinmoleküle, die mit der doppelsträngigen Nukleinsäure wechselwirkten, nun nicht mehr unter dem Einfluß der einzelsträngigen Nukleinsäure stehen, werden diese Moleküle durch die nun wieder einsetzende Dipol - Dipol - Wechselwirkung die Gesamtenergie des Systems erniedrigen. Dies bedeutet, daß ein Teil der Energie, die zur Denaturierung der Nukleinsäure notwendig ist, aus dem Energiegewinn durch die neu einsetzende Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle stammt. Ist diese Dipol - Dipol - Wechselwirkung hingegen nicht vorhanden, so muß die gesamte Energie zur Denaturierung der Nukleinsäure von außen zugeführt werden, d.h. die Nukleinsäure denaturiert bei höherer Tempera-

tur. Wie in Kap. 3.1.3. beschrieben, wird die Dipol - Dipol - Wechselwirkung von Phosphatidylcholin bereits durch geringe Mengen Phosphatidylserin unterbrochen, ohne daß eine äquivalente Dipol - Monopol - Wechselwirkun zwischen Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin an ihre Stelle tritt, wie in Abb. 40b veranschaulicht ist. Die Stabilisierung der Nukleinsäure durch eine Membran aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylserin ($x_{PS} = 0,2$) entspricht daher der Stabilisierung von DNA an einer Phosphatidylcholinmembran ohne Dipol - Dipol - Wechselwirkung, vermindert um den kleinen Betrag der Wechselwirkungsenergie, der aus der Verdünnung der Phosphatidylcholinmoleküle durch das Phosphatidylserin resultiert. Stearinsäure in Phosphatidylcholinmembranen beeinflußt durch seine negative Ladung lediglich die Energie der Bindung von Nukleinsäure an die Phosphatidylcholinmembran, ohne einen Einfluß auf die Kopfgruppen des Phosphatidylcholins auszuüben. Daher wird durch Stearinsäure lediglich eine Verringerung der Stabilisierung der DNA hervorgerufen.

Im molekularen Modell gibt es für die Konformationsänderung der Lipidkopfgruppen unter dem Einfluß der Nukleinsäure mindestens zwei Möglichkeiten:

1) Eine kleine Konformationsänderung, evtl. durch Drehung um α_4 (vgl. Abb. 7, Kap. 3.1.3.), durch welche die Kopfgruppe weitgehend in der Membranebene verbleibt und lediglich die quartäre Ammoniumgruppe (und damit auch der Dipol) aus der Membranebene herausgedreht wird;
2) Die Aufrichtung der gesamten Kopfgruppe, evtl. durch Rotation um die C2 - C3 - Achse des Glycerolrückgrates, wie in Kap. 3.1.3. beschrieben (Abb. 8).

Für die Erklärung der Entkopplung der Dipol - Dipol - Wechselwirkung von Phosphatidylcholin durch negativ geladenes Phospholipid werden in der Literatur drei Möglichkeiten diskutiert (58,59):

1) Eine schnelle Rotation der Kopfgruppe in der Membranebene;
2) Eine größere Entfernung der Kopfgruppen voneinander;
3) Eine Konformationsänderung der Kopfgruppe.

Die Rotation, der Phosphatidylcholinkopfgruppe um die C2 - C3 - Achse (39,45) des Glycerols (Abb. 8), könnte somit beide Wechselwirkungen in einem Mechanismus beschreiben. In Abb. 40 ist dieses Modell graphisch veranschaulicht.

Zu einer detaillierteren Beschreibung des Systems gelangt man mittels eines Energieniveaudiagramms zu einem zyklischen Prozess, in welchem der Gesamtprozess der Denaturierung membrangebundener Nukleinsäure in einzelne Teilschritte zerlegt ist. Ein Schema dieses Prozesses und das dazu gehörende Energieniveaudiagramm sind in Abb. 41 dargestellt. Die eingetragenen Zerlegungen beschreiben keine zeitliche Abfolge, sondern sollen lediglich eine bessere Übersicht über die beteiligten Energien ermöglichen. Dabei wird ausgenutzt, daß die Gibbs'sche Energie G eine Zustandsfunktion ist und es bei der Berechnung der Energiedifferenz ΔG zwischen zwei Zuständen gleichgültig ist, auf welchem Weg sich das System von einem Zustand in den anderen begibt (der Begriff "Weg" bezieht sich nicht auf eine Zeitkoordinate, sondern auf die Energiekoordinate G). Wird jeder Teilschritt des Prozesses reversibel geführt, so ist die Änderung der Gibbs'schen Energie nach Durchlaufen des Zyklus (von A nach A) gleich Null. Die Energien $\Delta G(0)$, $\Delta G(2)$, $\Delta G^{-}(2)$ und $\Delta G^{+}(2)$ bezeichnen den Energieunterschied zwischen einzel- und doppelsträngiger Nukleinsäure bei einer Temperatur unterhalb der Denaturierungstemperatur T_m. Die Indizes (0) und (2) beziehen sich gemäß der in Kap. 4.22. eingeführten Nomenklatur auf unbeeinflußte bzw. adsorbierte Nukleinsäure, die Indizes $^{-}$ und $^{+}$ beziehen sich auf die beiden Fälle einer Adsorption an Membranen ohne bzw. mit Dipol - Dipol - Wechselwirkung. Diese Energien ΔG sind mit dem T_m - Wert der Nukleinsäure korreliert, da für $T = T_m$ gilt: $\Delta G = 0$. Wird ΔG größer, bedeutet dies, daß die Temperatur, bei welcher $\Delta G = 0$ wird (also der T_m - Wert) sich erhöhen muß. $\Delta\varepsilon_{MD}$ bezeichnet die Dipol - Monopol -, $\Delta\varepsilon_{DD}$ die Dipol - Dipol - Wechselwirkungsenergie.

Die Bindung doppelsträngiger Nukleinsäure an die Membran zerfällt nach Abb. 41 in den Schritt A→B, in welchem Energie verbraucht wird, um n Dipol - Dipol - Wechselwirkungen zu unterbrechen ($+n\Delta\varepsilon_{DD}$), und den Schritt B→C, der Bindung der DNA an ein Membranstück ohne Dipol - Dipol - Wechselwirkung, in welchem Energie durch Ausbildung von n Dipol - Monopol - Wechselwirkungen gewonnen wird ($-n\Delta\varepsilon_{MD}$). Eine Adsorption von Nukleinsäure ist somit nur möglich, wenn die Dipol -

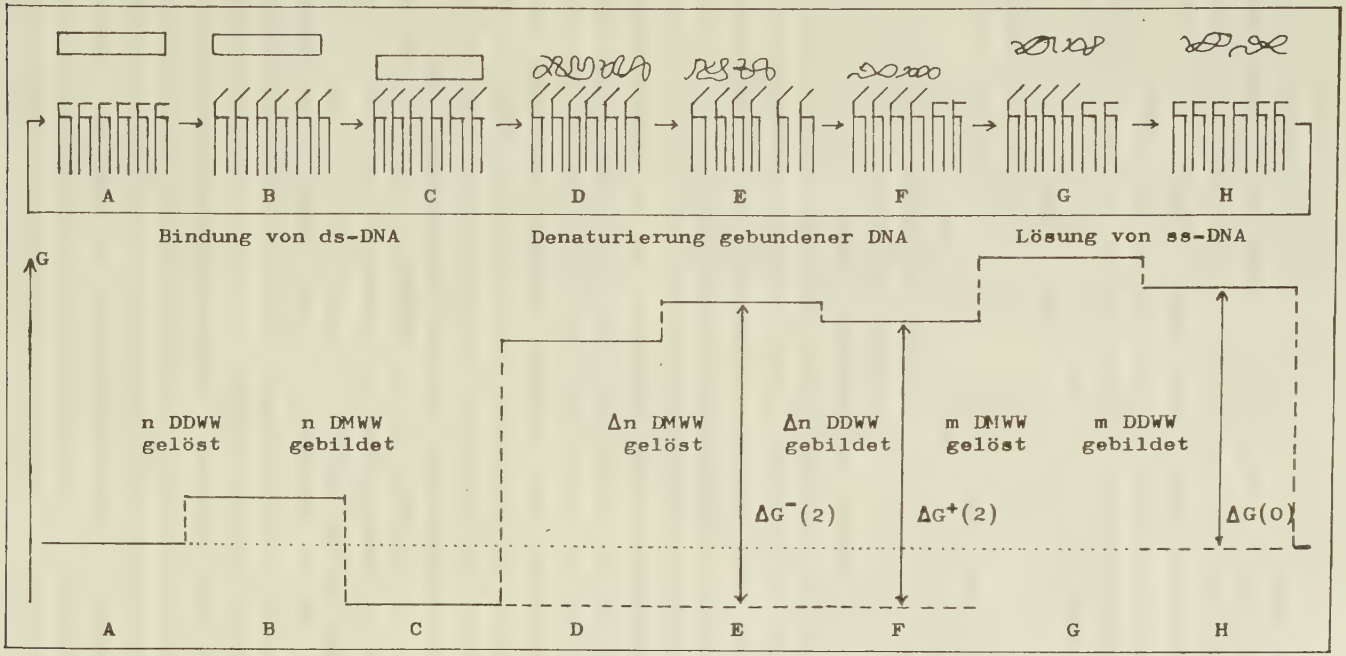

Abb. 41 Darstellung der Veränderungen an dem untersuchten System in einem zyklischen Prozess. Oben: Schema des Prozesses, unten: Energieniveaudiagramm. Die Abbildung ist im Text erläutert. Es bedeuten: ds-DNA: Doppelstrang-DNA; ss-DNA: Einzelstrang-DNA; DDWW: Dipol - Dipol - Wechselwirkung; DMWW: Dipol - Monopol - Wechselwirkung; n = Zahl der Dipole, die an der Wechselwirkung mit ds-DNA beteiligt sind; m = Zahl der Dipole, die an der Wechselwirkung mit ss-DNA beteiligt sind; $\Delta n = n - m$.

Dipol - Energie geringer ist als die Dipol - Monopol - Energie ($\Delta g_{DD} < \Delta g_{MD}$). Die Denaturierung der adsorbierten Nukleinsäure wird in solche Schritte zerlegt, daß alle Beiträge der Nukleinsäure - Membran - Wechselwirkung vom Helix - Knäuel - Übergang C⟶D getrennt werden. Somit wird bei dem Teilschritt C⟶D die gleiche Energie $\Delta G(0)$ verbraucht, wie bei dem Helix - Knäuel - Übergang unbeeinflußter Nukleinsäure. Das experimentell gefundene Ergebnis, daß Nukleinsäure unter dem Einfluß der Membran stets bei höherer Temperatur denaturiert als freie Nukleinsäure, wird in dem verwendeten Modell damit beschrieben, daß an der Wechselwirkung mit einzelsträngiger Nukleinsäure weniger dipolare Lipidkopfgruppen beteiligt sind als an der Wechselwirkung mit doppelsträngiger Nukleinsäure: $n-m:=\Delta n>0$, wobei n und m die Anzahl der Lipidmoleküle, die mit doppel- bzw. einzelsträngiger Nukleinsäure wechselwirken, bezeichnen (Abb. 41). Somit werden bei der Denaturierung Δn Dipol - Monopol - Wechselwirkungen gelöst (D⟶E), zu deren Unterbrechung die zusätzliche Energie $+\Delta n \Delta g_{MD} = \Delta G^{-}(2) - \Delta G(0)$ (Abb. 41) aufgewendet werden muß. Für den Fall, daß in der Membran eine Dipol - Dipol - Wechselwirkung existiert, erniedrigen die freigesetzten Lipidmoleküle die Energie des Systems um $-\Delta n \Delta g_{DD} = \Delta G^{-}(2) - \Delta G^{+}(2)$ (Abb. 41). Die folgenden Schritte F⟶G⟶H beschreiben die Dissoziation der einzelsträngigen Nukleinsäure von der Membran. Die reversible Renaturierung unbeeinflußter Nukleinsäure entspricht dem Übergang H⟶A mit $\Delta G(0)$, der Denaturierung von Nukleinsäure an einer Membran ohne Dipol - Dipol - Wechselwirkung entspricht der Übergang C⟶E, der Denaturierung von Nukleinsäure an einer Membran mit Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Übergang C⟶F. Aufgrund der oben beschriebenen Konstruktion des Kreisprozesses verbraucht der Übergang C⟶D ebenfalls die Energie $\Delta G(0)$ (Abb. 41).

Man kann daher Abb. 41 unmittelbar entnehmen, daß gilt:

$$\Delta G(2) = \Delta G(0) + \Delta n \cdot (\Delta g_{MD} - \Delta g_{DD}) \qquad \text{Gl. 11}$$

Hierbei ist noch anzumerken, daß Δg_{DD} keine lineare, sondern lediglich eine monotone Funktion von n ist und daß Δg_{MD} für die Wechselwirkung von doppelsträngiger Nukleinsäure mit der

Membran nicht gleich Δg_{MD} für die Wechselwirkung von einzelsträngiger Nukleinsäure mit der Membran ist. Die insgesamt durchgeführten Experimente charakterisieren das System aber noch nicht ausreichend, um diese Besonderheiten von Δg_{MD} und Δg_{DD} zu quantifizieren. Gl. 11 kann daher lediglich zu einer qualitativen Beschreibung der Richtung der gemessenen Effekte dienen, aber nicht zu einer quantitativen Angabe ihrer Größe. Zu einer qualitativen Beschreibung aber ist Gl. 11 auch ohne genauere Definition von Δg_{MD} und Δg_{DD} völlig ausreichend, wie im folgenden gezeigt werden soll:

Abhängigkeit der T_m - Werte von der Zusammensetzung der Membran (Abb. 38)

In einer reinen Phosphatidylcholinmembran gilt $\Delta g_{DD} > 0$, also

$$\Delta G(2) = \Delta G^{+}(2) = \Delta G(0) + \Delta n_o(\Delta g_{MD} - \Delta g_{DD}) \ .$$

Durch 20% Phosphatidylserin wird die Dipol - Dipol - Wechselwirkung des Phosphatidylcholin unterbrochen (59), so daß mit $\Delta g_{DD} = 0$ gilt

$$\Delta G(2) = \Delta G^{-}(2) = \Delta G(0) + \Delta n \Delta g_{MD} = \Delta G(0) + 0{,}8 \Delta n_o \Delta g_{MD}.$$

Daher ist $\Delta G^{-}(2) > \Delta G^{+}(2)$ (Abb. 41), so daß ein Anstieg von $T_m(2)$ durch Unterbrechung der Dipol - Dipol - Wechselwirkung erfolgt. Bei weiterer Zumischung von Phosphatidylserin verringert sich Δn weiter, wodurch $\Delta G(2)$ wieder abnimmt. Um bereits beim Wechsel von $x_{PS} = 0{,}0$ nach $x_{PS} = 0{,}2$ die Verdünnung des Phosphatidylcholins im Phosphatidylserin im Einfluß auf $\Delta G(2)$ zu berücksichtigen, wurde in Abb. 38 die Extrapolation von T_m auf $x_{PS} = 0{,}0$ eingetragen. Die so erhaltene Stabilisierung entspräche der Stabilisierung der Nukleinsäure durch eine reine Phosphatidylcholinmembran, wenn keine Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Kopfgruppen miteinander existierte.

Abhängigkeit der T_m - Werte von der Ionenstärke (Abb. 21a)

Die Messungen zu Abb. 21 wurden an reinen Phosphatidylcholinvesikeln durchgeführt. Daher gilt $\Delta g_{DD} > 0$. Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß die Kopfgruppen der Phospholipide nicht individuell durch Gegenionen abgeschirmt

werden (62,64), so daß Δg_{DD} = konstant > 0. Bei steigender NaCl - Konzentration erhöht sich die Dielektrizitätskonstante des wässrigen Mediums, so daß Δg_{MD} stetig abnimmt. Damit fällt auch $\Delta G(2) - \Delta G(0)$, also die Stabilisierung ΔT_m. Die Grenzionenstärke zwischen 50 mM und 100 mM NaCl ist dadurch charakterisiert, daß $\Delta g_{MD} = \Delta g_{DD}$, so daß $\Delta G(2) - \Delta G(0) = 0$ und weder eine Stabilisierung (Gl. 11) noch eine Bindung der Nukleinsäure an die Membran (Abb. 41) erfolgt.

Abhängigkeit der T_m - Werte von der Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylcholins (Abb. 35)

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, wie sich die Stabilisierung der Nukleinsäure $\Delta G(2) - \Delta G(0)$ infolge der Veränderung der Dipol - Monopol - Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran ($\Delta n \cdot \Delta g_{MD}$) verändert. Hierzu wurde entweder Δn oder Δg_{MD} variiert und die Dipol - Dipol - Wechselwirkung konstant gehalten oder auf Null verringert.

Aus Gl. 11 folgt jedoch, daß eine Veränderung der Stabilisierung auch aus einer Änderung der Dipol - Dipol - Wechselwirkung resultieren kann. Dies führte zur Möglichkeit, das Modell zu überprüfen. Aus dem deutlich geringeren Abstand der Cholinkopfgruppen in einer DPPC - Membran als in einer DOPC - Membran (siehe hierzu Kap. 3.1.3. und (117)) folgt, daß $\Delta g_{DD}^{DPPC} > \Delta g_{DD}^{DOPC}$. Benutzt man die gleiche Nukleinsäure und führt die Experimente bei gleicher Ionenstärke durch, so bleiben $\Delta G(0)$ und Δg_{MD} konstant. Damit läßt sich aus Gl. 11 voraussagen, daß Nukleinsäure durch eine DPPC - Membran weniger stark stabilisiert werden sollte als an einer DOPC - Membran. Die Aufgrund dieser Voraussage zur Überprüfung von Gl.11 durchgeführten Experimente sind in Kap. 4.2.6. beschrieben und bestätigten die Voraussage völlig. Der Unterschied der Dipol - Dipol - Wechselwirkungsenergien ist sogar so groß, daß er den Energiegewinn an DPPC - Membranen, der aus einer größeren Anzahl der an der Wechselwirkung beteiligten Moleküle resultiert ($\Delta n_{DPPC} > \Delta n_{DOPC}$), überkompensiert.

5.5. Die Verbreiterung des zweiten Überganges

Zur Erklärung der Verbreiterung des zweiten Überganges sind zur Zeit zwei Ansätze möglich. So kann die Verbreiterung entstehen aus einer Überlagerung mehrerer verschiedener Übergänge, die sich in ihrem T_m - Wert unterscheiden, selbst aber nicht verbreitert sind. In diesem Falle muß man davon ausgehen, daß verschiedene Nukleinsäuremoleküle verschieden stabilisiert werden, entlang eines Moleküls aber konstante Bedingungen herrschen (konstant bedeutet, daß der Einfluß der Umgebung kleiner ist als der Einfluß, der nötig wäre, um die Kooperativität zu verändern). Die zweite Möglichkeit ist, daß nur ein einziger Übergang existiert mit einem festen T_m - Wert und einer entsprechend großen Halbwertsbreite. Die Voraussetzungen für diesen Grenzfall sind, daß entlang eines Nukleinsäuremoleküls stark inhomogene Bedingungen vorliegen, diese Inhomogenitäten jedoch bei allen Molekülen den gleichen mittleren Einfluß ausüben.

Da Fluktuationen sowohl die Inhomogenität entlang eines Moleküls verändern als auch die Bedingungen für verschiedene Moleküle, kann eine Diskussion derartiger Phänomene nicht zur Klärung des Problems beitragen. Eine Verteilung des Abstandes verschiedener DNA - Moleküle von der Membran führt zwar zu einer entsprechenden Verteilung der T_m - Werte, da allerdings der Durchmesser eines DNA - Moleküls vergleichbar ist mit der Reichweite der elektrostatischen Membranpotentiale, befindet sich bereits ein Nukleinsäuremolekül nicht in einem einheitlichen Feld. Darüberhinaus ist die Persistenzlänge der DNA bei den verwendeten Ionenstärken vergleichbar mit dem Krümmungsradius der Vesikel (91), so daß bereits verschiedene Punkte des gleichen Moleküls verschiedene Abstände von der Membran haben. Dies wiederum würde sich auf die Kooperativität und damit auf $\Delta T_{1/2}$ auswirken. Eine Verringerung der Kooperativität ist auch aufgrund der hohen Nukleinsäurekonzentration auf der Membran zu erwarten. Mit dieser Erklärung kann die Verbreiterung des zweiten Überganges konsistent aus der Organisation der Nukleinsäure im Vesikel hergeleitet werden. Wie in Kap. 3.2.1. beschrieben, ist die Kooperativität ein Maß dafür, um wieviel die Bildung des ersten Basenpaares eines Doppelstranges unwahrscheinlich-

er ist als die Bildung eines Basenpaares neben einem bereits gebildeten. Da offensichtlich nicht nur doppelsträngige, sondern auch einzelsträngige Nukleinsäure an der Membran adsorbiert ist (Kap. 5.2.), existieren auf der Membran lokal hohe Nukleinsäurekonzentrationen, so daß die Bildung des ersten Basenpaares erleichtert wird. Dies ist gleichbedeutend mit einer Verringerung der Kooperativität.

Eine endgültige Entscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten (- Verbreiterung durch Überlagerung unverbreiterter Übergänge oder Verbreiterung eines Überganges durch Kooperativitätsverringerung -) ist aber nur experimentell möglich. Speziell kinetische Messungen, wie sie mit der Temperatursprungmethode (T - Jump) durchführbar sind, können zur Klärung des Problems beitragen (83). So ist für die hochkooperative Denaturierung im Falle der Überlagerung zahlreicher schmaler Übergänge für die Dissoziation ein wesentlich größerer Zeitbedarf zu erwarten als für eine unkooperative Denaturierung kurzer DNA - Bereiche im Falle eines breiten Überganges. Die Existenz verschiedener Nukleinsäurespezies mit verschiedenen T_m - Werten bedeutet weiterhin, daß verschiedene Spezies verschiedene Geschwindigkeitskonstanten haben, so daß sich für diesen Fall kein einheitlicher Prozess erwarten liesse. Ein breiter, unkooperativer Übergang einer einzigen Spezies hingegen würde sich als einheitlicher Prozess durch definierte Geschwindigkeitskonstanten beschreiben lassen.

Bei der Durchführung der T - Jump - Experimente ist allerdings mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten zu rechnen. Der Temperatursprung wird erzeugt durch die Entladung eines Kondensators über die Meßzelle. Der Stromfluß bewirkt innerhalb einiger Mikrosekunden die Aufheizung der Lösung auf die gewünschte Endtemperatur (83). Man weiß aber, daß Lipidmembranen unter dem Einfluß starker elektrischer Feldimpulse ihre Permeabilität kurzzeitig stark verändern, und auf diese Weise Lipidvesikel eingeschlossenes Material freisetzen oder in hoher Ausbeute zu größeren Aggregaten fusionieren (118). Es müssen daher zuerst Wege gefunden werden, die diese beim T - Jump unerwünschten Erscheinungen ausschalten.

5.6. Abschließende Betrachtungen

In natürlichen Systemen befindet sich Nukleinsäure nicht nur im Kontakt mit Proteinen, sondern in einigen Fällen, wie bereits in Kap. 1.1. ausgeführt, auch im Kontakt mit Membransystemen. Zumindest im Falle der Assoziation des "origin of replication" des Bakteriengenoms mit der Membran (6) ist nachgewiesen, daß die Anwesenheit von Lipiden mit intakten Kopfgruppen (9) für die Funktion des Komplexes und damit die Funktion der Nukleinsäure existentiell ist (11) (vgl. Kap. 1.1.). Um bei der Wechselwirkung der Nukleinsäure mit biologischen Membranen zwischen der Wechselwirkung mit Proteinen und der Wechselwirkung mit Lipiddoppelschichten differenzieren zu können, müssen beide Wechselwirkungen notwendigerweise zuerst getrennt untersucht werden, auch wenn die Wechselwirkung der Nukleinsäure mit beiden Stoffklassen zusammen mit Sicherheit nicht die Summe beider Wechselwirkungen ist (siehe unten). Ein Ergebnis dieser Arbeit ist, daß eine Attraktion zwischen Nukleinsäure und Lipidmembranen nachgewiesen wurde, wenn diese Membran dipolares Lipid enthält. Für den Fall, daß die gemessene starke Verbreiterung bei der Denaturierung membrangebundener DNA auf einer Verringerung der Kooperativität der Nukleinsäure beruht (vgl. Kap. 5.5.), läßt sich abschätzen, daß die noch verbleibende kooperative Länge (vgl. Kap. 3.2.1.) etwa 50 Basenpaare beträgt und damit im Bereich natürlicher Promotorregionen liegt. Das Aufschmelzen kurzer Bereiche der DNA kann dann durch den Membrankontakt erleichter sein. Allerdings zeigte es sich auch, daß die Nukleinsäure - Membran - Wechselwirkung bereits bei Ionenstärken unterbrochen wird, die unter der physiologischen Ionenstärke liegen. Es ist aber anzunehmen, daß die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran, die, wie hier gezeigt, ohne Proteine möglich ist, in natürlichen Systemen durch Proteine stark modifiziert werden kann.

Wie in Kap. 5.4. beschrieben, lassen die Messungen zur Stabilität der gebundenen Nukleinsäure auch Aussagen über die Stabilität der Membranen zu. Eine große Stabilisierung gebundener Nukleinsäure bedeutet in dem vorgestellten Modell eine geringe oder gänzlich fehlende Dipol - Dipol - Wechsel-

wirkungsenergie in der Membran und damit das Fehlen einer die Membran stabilisierenden Energie. Je stärker eine Membran gebundene Nukleinsäure stabilisiert, um so instabiler sollte die Membran selbst sein. In Übereinstimmung mit dieser Aussage wurde in der Literatur berichtet, daß Vesikel aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylserin die instabilsten Vesikel überhaupt sind, und daß Vesikel aus Lipidenden mit gesättigten Fettsäuren stabiler sind als Vesikel aus Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren (43). Dies mag eine Ursache dafür sein, daß sich Vesikel aus 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylserin bei genetic - engineering - Experimenten besonders bewährt haben (z.B. (24)), da eine hohe Instabilität der Vesikel auf eine große Fusionsbereitschaft der Vesikel mit Zellmembranen schließen lässt. Eine ähnliche Zusammensetzung ist sogar bei natürlichen Membranen zu beobachten. So enthalten Myoblasten vor ihrer Fusion zu Muskelgewebe 20% negativ geladenes Lipid in ihrer Membran, während dieser Anteil unmittelbar nach der Fusion auf 2% reduziert wird (119).

Durch Anwendung anderer Meßmethoden lassen sich Voraussagen aus dem Modell zur Beschreibung der gemessenen Effekte überprüfen und wesentliche Parameter des Systems bestimmen. Eine Bestimmung des Abstandes der adsorbierten Nukleinsäure von der Membran sollte mittels Fluoreszenzmessungen möglich sein. Markiert man Nukleinsäure und Lipidmembran mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen, so ist Förstertransfer zu erwarten, wenn der Abstand zwischen Nukleinsäure und Membran unter 4 bis 5 nm liegt, wie in Kap. 5.2. aufgrund der Reichweiten der elektrostatischen Potentiale angenommen wurde. Somit liesse sich qualitativ überprüfen, ob die Nukleinsäure auf der Membran adsorbiert ist. Bei Kenntnis der Stoffkonstanten der Fluoreszenzfarbstoffe kann unter günstigen Bedingungen der Abstand zwischen Nukleinsäure und Membran auch berechnet werden. Nach dem in Kap. 5.4. vorgestellten Modell erfolgt unter dem Einfluß der Nukleinsäure eine Konformationsänderung der Lipidkopfgruppen, welche die Dipol - Dipol-Wechselwirkung in der Membran verringert oder unterbricht. Diese Aussage läßt sich mit Hilfe der NMR - Spektroskopie überprüfen. Assoziiert man DNA mit Phosphatidylcholinmembra-

nen, bei welchen die Kopfgruppen der Lipidmoleküle an C31 und C32 deuteriert sind (siehe Abb. 7, Kap. 3.1.3.), so kann man mit Deuterium - NMR - Spektroskopie eine Konformationsänderung der Lipidkopfgruppen messen (44,55). Voraussezung ist allerdings, daß wegen der geringen Empfindlichkeit der Methode eine große Zahl von Lipidmolekülen mit der Nukleinsäure in Kontakt kommt. Der Vorteil der Methode ist, daß auf diese Weise Bindungsstudien möglich sind (55,117).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sixl und Watts, die 1983 berichteten, daß Phosphatidylcholinmembranen ihre Eigenschaften durch Beimischung der negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol stark verändern (58,59). So sind in Abb. 42 alle Korrelationen zwischen Stabilisierung und Verbreiterung von adsorbiertem poly A·poly U zusammengestellt. Der unterschiedliche Einfluß von reinen Phosphatidylcholinmembranen und Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Mischmembranen auf die Nukleinsäure ist deutlich zu erkennen.

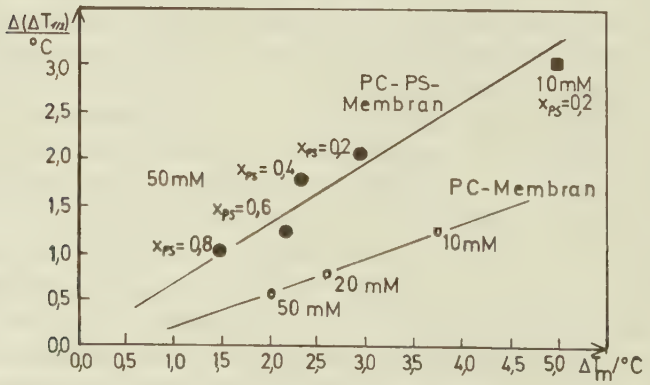

Abb. 42 Korrelation zwischen Stabilisierung und Verbreiterung für poly A·poly U in PC - Vesikeln (o) (aus Abb. 22c) und in PC - PS - Vesikel (●) (aus Abb. 28c) und (■) (aus Kap. 4.2.3., Text). Eingetragen ist die NaCl - Konzentration und die Zusammensetzung der Membran in Molenbrucheinheiten von PS.

Wie in Kap. 4.2.4. beschrieben, verhält sich poly A · poly U in Vesikeln aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylglycerol - Membranen wie in Vesikeln aus Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - Membranen. Hieraus muß nach Kap. 5.4. gefolgert werden, daß Phosphatidylserin auf Phosphatidylcholin den gleichen Einfluß ausübt wie Phosphatidylglycerol. Auch dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sixl und Watts (58,59).

Aus der Tatsache, daß definierte Lipidmembranen bereits unter dem Einfluß geringer Mengen chemisch ähnlicher Lipide ihre Eigenschaften grundlegend verändern können, schlossen Sixl und Watts, daß in Anwesenheit von Proteinen prinzipiell neue Eigenschaften von Lipiddoppelschichten zu erwarten sind. In diesem Sinne ist es notwendig, in einem nächsten Schritt die Veränderung der Wechselwirkung zwischen Lipidmembranen und Nukleinsäure unter dem Einfluß von Proteinen zu untersuchen. Eine direkte Möglichkeit besteht in der Erweiterung eines in dieser Arbeit verwendeten Systems. So berichteten M.Argast und C.F.Beck, daß der TET - Repressor, der an das in den Experimenten zu dieser Arbeit verwendete 187 bp DNA - Fragment bindet (120), in Vesikel vom REV - Typ eingeschlossen werden konnte, ohne daß eine Denaturierung des Proteins erfolgte (121). Der Einschluß von DNA - Repressor - Komplex in Vesikel wäre somit eine Möglichkeit, um Nukleinsäure - Protein - Wechselwirkungen unter dem Einfluß einer Lipidmembran zu untersuchen. Auch von spezifisch nukleinsäurebindenden Membranproteinen (Porinen) wurde berichtet (122), so daß sich zur Erweiterung der Untersuchungen auf ternäre Nukleinsäure - Protein - Lipidmembran - Systeme eine Vielzahl von Möglichkeiten ergibt.

6. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Lipidmembranen wurden molekular einheitliche und in ihrer Sequenz bekannte Nukleinsäuren in Phospholipidvesikel eingeschlossen. Die Doppelhelix - Knäuel - Übergänge - auch als thermische Denaturierung bezeichnet - der eingeschlossenen Nukleinsäure wurden mit den Übergängen frei gelöster Nukleinsäure verglichen. Die Untersuchungen wurden an poly A·poly U und zwei verschiedenen DNA - Fragmenten (179 Basenpaare, 56% GC - Gehalt und 187 Basenpaare, 38% GC - Gehalt) durchgeführt. Die Übergänge dieser Nukleinsäuren, wenn frei in Lösung, sind hochkooperativ. Als Lipide wurden Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol mit gemischten oder einheitlichen Fettsäureketten verwendet. Als Methode zur Präparation von Vesikeln wurde die Methode der "Reverse - phase - evaporation - vesicles" (REV) verwendet. Die Konzentration der Nukleinsäure im Puffer betrug 25 A_{260}/ml, das Präparationsvolumen wurde auf 100 µl Puffer optimiert. Aus der elektronenmikroskopischen Charakterisierung der Vesikel ergab sich durch Mittelung über das Volumen ein Durchmesser von 180 nm. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß die Vesikel weder aggregieren noch bei hoher Temperatur Nukleinsäure freisetzen. Die Menge eingeschlossener 187 bp DNA bei 10 mM NaCl wurde zu 50 Molekülen pro Vesikel bestimmt. Der Nukleinsäureeinschluß verringert sich stark mit steigender Ionenstärke.

Die thermische Denaturierung wurde anhand der UV - Absorptionsänderung in einem Spektralphotometer des Typs Sigma ZWS 11 gemessen, bei dem die Steuerung des Systems und die Datenaufnahme über einen Mikrocomputer erfolgte. Trübungseffekte der Vesikel, die sich der optischen Absorption der Nukleinsäure überlagern, wurden durch simultane Messung bei zwei Wellenlängen separiert.

Die thermische Denaturierung von Nukleinsäure in Vesikeln aus reinem Phosphatidylcholin oder Mischungen aus Phosphatidylcholin mit Phosphatidylserin oder Phosphatidylglycerol erfolgt grundsätzlich in zwei Übergängen. Es tritt ein Übergang mit der Mittelpunktstemperatur (T_m) und der Halb-

wertsbreite ($\Delta T_{1/2}$) der frei gelösten Nukleinsäure auf. Ein zweiter Übergang liegt stets bei höheren Temperaturen und ist verbreitert. Aus der Unempfindlichkeit von poly A· poly U gegen hitzestabile RNase A außerhalb der Vesikel wurde geschlossen, daß beide Helix - Knäuel - Übergänge von Nukleinsäure stammen, die im Vesikel eingeschlossen ist, und daß demzufolge die Nukleinsäure im Vesikel in zwei verschiedenen Populationen vorliegt.

Mit steigender Ionenstärke verringert sich die Differenz zwischen den T_m - Werten und verschwindet bei 100 mM NaCl. Hieraus folgt, daß die Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Membran im Wesentlichen elektrostatischer Natur ist. Aus der Reichweite der Potentiale läßt sich abschätzen, daß die wechselwirkende Nukleinsäurepopulation in unmittelbarer Nähe der Membran lokalisiert sein muß und daher als adsorbiert zu betrachten ist, während die Population mit den T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werten der frei gelösten Nukleinsäure offensichtlich ohne Membrankontakt im Inneren der Vesikel gelöst ist. Da die membranassoziierte Nukleinsäure bei höherer Temperatur denaturiert als die unbeeinflußte, ist die Wechselwirkungsenergie Membran - Doppelstrang größer als die Wechselwirkungsenergie Membran - Einzelstrang.

Der Einfluß der Zusammensetzung der Lipidmembran auf die Wechselwirkung mit Nukleinsäuren wurde mit Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin - oder Phosphatidylcholin - Phosphatidylglycerol - Mischungen bestimmt. Bei Variation der Lipidzusammensetzung der Vesikel von reinem Phosphatidylcholin zu 80% Phosphatidylcholin und 20% Phosphatidylserin steigen T_m - und $\Delta T_{1/2}$ - Werte deutlich an und fallen bei weiter steigendem Phosphatidylseringehalt wieder ab. In Vesikeln aus negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin wurde nur der Übergang der unbeeinflußten Nukleinsäure gemessen.

Dieses Verhalten wird modellhaft erklärt aus der Konkurrenz zwischen einer Dipol - Dipol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle miteinander und einer Dipol - Monopol - Wechselwirkung der Phosphatidylcholinmoleküle mit der negativ geladenen Nukleinsäure. Geringe Mengen an Phospha-

tidylserin unterbrechen die Dipol - Dipol - Wechselwirkung zwischen den Phosphatidylcholinmolekülen und können damit zu einer Erhöhung der Wechselwirkung mit der Nukleinsäure führen. Bei weiterer Zunahme des Phosphatidylseringehalts nimmt allerdings die Zahl der Dipole so stark ab, daß insgesamt die Wechselwirkung mit der Nukleinsäure abnehmen muß, bis sie bei reinem Phosphatidylserin nicht mehr nachzuweisen ist.

Nach diesem Modell ist vorauszusagen, daß die Stärke der Dipol - Dipol - Wechselwirkung in der Membran in umgekehrtem Verhältnis zur Stabilisierung der gebundenen Nukleinsäure steht. Vergrößert man daher den Abstand der Cholinkopfgruppen in der Membran durch Einführung sperriger Fettsäurereste, so verringert sich die Stärke der Dipol - Dipol - Wechselwirkung und nach obigem Modell sollte dies zu einer Erhöhung des T_m - Wertes der adsorbierten Nukleinsäure führen. Diese Voraussage wurde durch Verwendung von Dipalmitoylphosphatidylcholin (geringer Abstand der Kopfgruppen) und Dioleoylphosphatidylcholin (großer Abstand der Kopfgruppen) überprüft. In Übereinstimmung mit dem Modell wurde eine deutliche T_m - Werterhöhung von adsorbierter DNA in Dioleoylphosphatidylcholinvesikeln gegenüber von DNA in Dipalmitoylphosphatidylcholinvesikeln gemessen.

Die an Modellsystemen gefundenen Ergebnisse wurden in Bezug auf die Eigenschaften natürlicher zellulärer Membrankomplexe diskutiert.

7. Literaturverzeichnis

(1) S. Jothy, J.-L. Bilodeau, H. Simpkins,
Can. J. Biochem. 53, 1039 - 1045, (1975).
"The role of membrane proteins and phospholipids in the interaction of ribosomes with endoplasmic reticulum membranes"

(2) T. Scott - Burdes, A. O. Hawtry,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1288 - 1295, (1973).
"The effect of neuraminidase treatment of ribosome - free membranes on their ribosomal reattachment ability"

(3) M. A. Lande, M. Adesnik, M. Sumida, Y. Tashiro,
D. D. Sabatini,
J. Cell Biol. 65, 513 - 528, (1975).
"Direct association of messenger RNA with microsomal membranes in human diploid fibroblasts"

(4) D. G. Capco, W. R. Jeffrey,
Dev. Biol. 89, 1 - 12, (1982).
"Transient localization of messenger RNA in Xenopus laevis oocytes"

(5) K. Shiokawa,
FEBS Lett. 151, 179 - 184, (1983).
"Mobilization of maternal mRNA in amphibian eggs with special reference to the possible role of membraneous supramolecular structures"

(6) P. Benjamin, P. Strumph, M. Kenny, W. Firsheim,
Nature 298, 769 - 771, (1982).
"DNA synthesis in purified DNA - membrane complexes extracted from a Bacillus subtilis pol A mutant"

(7) S. Horowitz, R. J. Doyle, F. E. Young, U. N. Streips,
J. Bacteriol. 138, 915 - 922, (1979).
"Selective association of the chromosome with membrane in a stable L - form of Bacillus subtilis"

(8) K. Yamaguchi, H. Yoshikawa,
Nature, New Biology 244, 204 - 206, (1973).
"Topography of chromosome membrane junctions in Bacillus subtilis"

(9) V. G. Bezlepkin, Y. Y. Malinowsky, A. J. Gaziev, Stud. Biophys. 87, 267 - 268, (1982). "Role of DNA interactions with membrane structures in bacterial cells upon induction of DNA repair synthesis"

(10) H. Joenje, W. N. Konings, G. Venema, J. Bacteriol. 121, 771 - 776, (1975). "Interactions between exogenious deoxyribonucleic acid and membrane vesicles isolated from competent and noncompetent Bacillus subtilis"

(11) M. J. Daniels, Biochem. J. 122, 197 - 207, (1971). "Some features of the bacterial membrane studied with the aid of a new fractionation technique"

(12) F. A. Manzoli, J. H. Muchmore, B. Bonova, S. Capitani, S. Bartoli, Biochim. Biophys. Acta 340, 1 - 15, (1974). "Lipid - DNA interactions. II. Phopholipids, cholesterol, glycerophosphorylcholine, spingosine and fatty acids"

(13) I. I. Danilenko, Stud.Biophys. 87, 271 - 272, (1982). " ПРИРОДА ЛИПИД-НУКЛЕИНОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ "

(14) R. M. Hoffman, L. B. Margolis, L. D. Bergelson, FEBS Lett. 93, 365 - 368, (1978). "Binding and entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes"

(15) B. E. Ryman, D. A. Tyrrell, Essays in Biochemistry , Biochem. Soc. Publ. (1981), "Liposomes - bags of potential" p. 49 - 98.

(16) R. T. Fraley, C. S. Fornari, S. Kaplan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3348 - 3552, (1979). "Entrappment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer"

(17) P. F. Lurquin, Nucl. Acids Res. 6, 3773 - 3784, (1979). "Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts"

(18) T. Wilson, D. Papahadjopoulos, R. Taber,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3471 - 3475, (1977).
"Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vesicles: Antibody resistance and infectivity in virus resistant cells"

(19) A. B. Mukherjee, S. Orloff, J. D. Butler, T. Triche, P. Lalley, J. D. Schulman,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1362 - 1365, (1978).
"Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid - vesicles (lipochromosomes): Carrier potential in gene transfer"

(20) T.-K. Wong, C. Nicolau, P. H. Hofschneider,
Gene 10, 87 - 94, (1980).
"Appearance of β - lactamase activity in animal cells upon liposome - mediated gene transfer"

(21) R. Fraley, D. Papahadjopoulos,
Trends Biochem. Sci. 6, 77 - 80, (1981).
"New generation liposomes: The engineering of an efficient vehicle for intracellular delivery of nucleic acids"

(22) F. Szoka, K. E. Magnusson, J. Wojcieszyn, Y. Hou, Z. Derzko, K. Jacobson,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1685 - 1689, (1981).
"Use of lectins and polyethyleneglycol for fusion of glycolipid - containing liposomes with eucaryotic cells"

(23) S. X. Straub, R. F. Garry, W. E. Magee,
Infec. Immun. 10, 783 - 792, (1974).
"Interferon induction by poly I•poly C, enclosed in phospholipid particles"

(24) C. Nicolau, A. Le Pape, P. Soriano, F. Fargette, M.-F. Juhel,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1068 - 1072, (1983).
"*In vivo* expression of rat insulin after intravenious administration of the liposome - entrapped gene for rat insulin I"

(25) F. Szoka, D. Papahadjopoulos,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4194 - 4198, (1978).
"Procedure for preparation of liposomes with large internal space and high capture by reverse - phase evaporation"

(26) G. Steger,
Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt (1984).
"Strukturumwandlung von Viroiden, Virusoiden und Satelliten - Ribonukleinsäuren in Theorie und Experiment"

(27) W. S. Singleton, M. S. Gray, M. L. White,
J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 53 - 56, (1965).
"Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids"

(28) B.N. Ames, D. T. Dubin,
J. Biol. Chem. 235, 769 - 775, (1960).
"The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid"

(29) J. M. Brewer, A. J. Pesce, R. B. Ashworth,
"Experimental techniques in biochemistry", p.3 - 4,
Prentice Hall Inc., New Jersey (1974).

(30) C.-H. Huang,
Biochem. 8, 344 - 352, (1969).
"Studies on phospholipid vesicles. Formation and physical characteristics"

(31) E. Ritt, D. Walz,
J. Membrane Biol. 27, 41 - 54, (1976).
"Pigment containing lipid vesicles. I. Preparation and characterization of chlorophyll α - lecithin vesicles"

(32) J. Wischut, N. Düzgünes, R. Fraley, D. Papahadjopoulos,
Biochem. 19, 6011 - 6021, (1980).
"Studies on the mechanism of membrane fusion: Kinetics of calcium ion induced fusion of phosphatidylserin vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle content"

(33) G. J. Dimitriadis,
FEBS Lett. 86, 289 - 293, (1978).
"Entrapment of ribonucleic acids in liposomes"

(34) L. K. Tamm (1981),
Persönliche Mitteilung

(35) Ann. N.Y. Acad. Sci. 308, 343 - 370, (1978).
Diskussionsprotokoll

(36) N. Oku, J. F. Scheerer, R. C. MacDonald,
Biochim. Biophys. Acta 692, 384 - 388, (1982).
"Preparation of giant liposomes"

(37) J. N. Israelachvili, D. J. Michell, B. N. Ninham,
Biochim. Biophys. Acta 470, 185 - 201, (1977).
"Theory of self - assembly of lipid bilayers and vesicles"

(38) J. N. Israelachvili, D. J. Michell, B. N. Ninham,
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 72, 1525 - 1568, (1976).
"Theory of self - assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers"

(39) H. Hauser, J. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell,
Biochim. Biophys. Acta 650, 21 - 51, (1981).
"Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine"

(40) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins,
J. Mol. Biol. 13, 238 - 252, (1965).
"Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids"

(41) J. T. Mason, C. Huang,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 308, 29 - 49, (1978).
"Hydrodynamic analysis of egg phosphatidylcholine vesicles"

(42) F. Szoka, F. Olson, T. Hearth, W. Vail, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos,
Biochim. Biophys. Acta 601, 559 - 571, (1980).
"Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1 - 0.2 µm) by a combination of reverse - phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes"

(43) F. Szoka, D. Papahadjopoulos,
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 - 508, (1980).
"Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)"

(44) J. Seelig, A. Seelig,
Quart. Rev. Biophys. 13, 19 - 61, (1980).
"Lipid conformation in model membranes and biological membranes"

(45) H. Hauser, W. Guyer, J. Pascher, P. Skrabal, S. Sundell,
Biochem. 19, 366 - 373, (1980).
"Polar group conformation of phosphatidylcholine. Effect of solvent and aggregation"

(46) K. Zakrzewska, B. Pullman,
FEBS Lett. 135, 268 - 272, (1981).
"The electrostatic potential of a model phosphatidylcholine mono - and bilayer"

(47) P. L. Yeagle, W. C. Hutton, C.-H. Huang, R. B. Martin,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3477 - 3481, (1975).
"Headgroup conformation and lipid - cholesterol association in phosphatidylcholine vesicles: A $^{31}P\{^{1}H\}$ nuclear Overhauser effect study"

(48) P. L. Yeagle, W. C. Hutton, C.-H. Huang, R. B. Martin,
Biochem. 15, 2121 - 2124, (1976).
"Structure in the polar head region of phospholipid bilayers: A $^{31}P\{^{1}H\}$ nuclear Overhauser effect study"

(49) R. A. Burns, R. E. Stark, D. A. Vidusek, M. F. Roberts,
Biochem. 22, 5084 - 5090, (1980).
"Dependence of phosphatidylcholine phosphorus - 31 relaxation times and $^{31}P\{^{1}H\}$ nuclear Overhauser effect distribution on aggregate structure"

(50) J. L. Browning,
Biochem. 20, 7144 - 7151, (1981).
"Motions and interactions of phospholipid headgroups at the membrane surface. 3. Dynamic properties of amine - containing head groups"

(51) E. Sackmann,
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 82, 891 - 909, (1978).
"Dynamic molecular organization in vesicles and membranes"

(52) P. L. Yeagle, W. C. Hutton, R. B. Martin,
J. Biol. Chem. 251, 2110 - 2112, (1976).
"Transmembrane asymmetry of vesicle lipids"

(53) R. A. Demel, W. S. M. Geurts van Kessel, L. L. van Deenen,
Biochim. Biophy. Acta. 266, 26 - 40, (1972).
"The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol"

(54) R. P. Rand,
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10, 277 - 314, (1981).
"Interacting phospholipid bilayers: Measured forces and induced structural changes"

(55) H. Akutsu, J. Seelig,
Biochem. 20, 7366 - 7373, (1981).
"Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes"

(56) C. G. Brouillette, J. P. Segrest, T. C. Ng, J. L. Jones,
Biochem. 21, 4569 - 4575, (1982).
"Minimal size phosphatidylcholine vesicles: Effects of radius of curvature on head group packing and conformation"

(57) J. R. Browning,
Biochem. 20, 7133 - 7143, (1981).
"Motions and interactions of phospholipid headgroups at the membrane surface. 2. Headgroups with hydroxyl-groups"

(58) F. Sixl, A. Watts,
Biochem. 21, 6446 - 6452, (1982).
"Interactions between phospholipid headgroups at membrane interfaces: A deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance and spin - label electron spin resonance study"

(59) F. Sixl, A. Watts,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1613 - 1615, (1983).
"Headgroup interactions in mixed phospholipid bilayers"

(60) G. Cevc, D. Marsh,
J. Phys. Chem. 87, 376 - 379, (1983).
"Properties of the electrical double layer near the interface between a charged bilayer membrane and electrolyte solution: Experiment vs. theory"

(61) E. Brosio, F. Conti, A. di Nola, G. Napolitano, A. L. Kovaċs,
Chem. Phys. Lipids 27, 127 - 138, (1980).
"Stereochemical model for phospholipids. III. Molecular conformation and molecular packing of phosphatidylserine"

(62) H. Hauser, G. G. Shipley,
Biochem. 22, 2171 - 2178, (1983).
"Interactions of monovalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes"

(63) F. Lakhdar - Ghazal, J.-L. Tichadou, J.-F. Tocanne,
Eur. J. Biochem. 134, 531 - 537, (1983).
"Effect of pH and monovalent cations on the ionization state of phosphatidylglycerol in monolayers"

(64) A. G. Lee,
Biochim. Biophys. Acta 472, 237 - 281, (1977).
"Lipid phase transitions and phase diagrammes. I. Lipid phase transitions"

(65) M. Eisenberg, T. Gresalfi, T. Riccio, S. McLaughlin,
Biochem. 18, 5213 - 5223, (1979).
"Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids"

(66) S. G. A. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman,
J. Gen. Physiol 58, 667 - 687, (1971).
"Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes"

(67) D. A. Haydon, S. B. Hladky,
Quart. Rev. Biophys. 5, 187 - 282, (1972).
"Ion transport across lipid membranes: A critical discussion of mechanisms in selected systems"

(68) O. Söderman, G. Arvidson, G. Lindblom, K. Fontell,
Eur. J. Biochem. 134, 309 - 314, (1983).
"The interactions between monovalent ions and phosphatidylcholines in aqueous bilayers"

(69) R. C. MacDonald, S. A. Simon, E. Baer,
Biochem. 15, 885 - 891, (1976).
"Ionic influences on the phase transition of dipalmitoylphosphatidylserine"

(70) E. J. Luna, H. McConnell,
Biochim. Biophys. Acta 470, 303 - 316, (1977).
"Lateral phase separation in binary mixtures of phospholipids having different charges and different crystalline structures"

(71) C. Grabielle- Madelmont, R. Perron,
J. Colloid Interface Sci. 95, 471 - 482, (1983).
"Calorimetric studies on phospholipid - water systems. I. DL - Dipalmitoylphosphatidylcholine - water systems"

(72) K. Jacobson, D. Papahadjopoulos,
Biochem. 14, 152 - 161, (1975).
"Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations"

(73) B. R. Lentz, D. R. Alford, M. Hoechli, F. A. Dombrose,
Biochem. 21, 4212 - 4219, (1982).
" Phase behaviour of mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine multilamellar and unilamellar vesicles"

(74) E. J. Schimschick, H. McConnell,
Biochem. 12, 2351 - 2360, (1973).
"Lateral phase separation in phospholipid membranes"

(75) J. A. Berden, R. W. Barker, G. K. Radda,
Biochim. Biophys. Acta 375, 186 - 208, (1975).
"NMR - Studies of phospholipid bilayers. Some factors affecting their lipid distribution"

(76) S.-J. Ohnishi, T. Ito,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 132 - 138, (1973).
"Clustering of lecithin molecules in phosphatidylserine membranes, induced by calcium ion binding to phosphatidylserine"

(77) S.-J. Ohnishi, T. Ito,
Biochem. 13, 881 - 887, (1974).
"Calcium - induced phase separations in phosphatidylserine - phosphatidylcholine membranes"

(78) M. F. Brown, J. Seelig,
Biochem. 17, 381 - 384, (1978).
"Influence of cholesterol on the polar region of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers"

(79) F. T. Presti, R. J. Pace, S. I. Chan,
Biochem. 21, 3831 - 3835, (1982).
"Cholesterol - phospholipid interaction in membranes. 2. Stoichiometry and molecular packing of cholesterol - rich domains"

(80) F. T. Presti, S. I. Chan,
Biochem. 21, 3821 - 3830, (1982).
Cholesterol - phospholipid interaction in membranes. 1. Cholestane spin - label studies of phase behaviour of cholesterol - phospholipid liposomes.

(81) P. N. Yi, R. C. MacDonald,
Chem. Phys. Lipids 11, 114 - 134, (1973).
"Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine"

(82) M. Petersheim, D. H. Turner,
Biochem. 22, 256 - 263, (1983).
"Base stacking and base pairing contributions to helix stability: Thermodynamics of double helix formation"

(83) D. Riesner, R. Römer,
"Thermodynamics and kinetics of conformational transitions in oligonucleotides and tRNA"
aus:
"Physico - chemical properties of nucleic acids"
Vol. 2, p.237 - 318, ed. Duchesne,
Academic Press, London 1973.

(84) W. Hillen, T. C. Goodman, R. D. Wells,
Nucl. Acids Res. 9, 415 - 436, (1981).
"Salt dependence and thermodynamic interpretation of the thermal denaturation of small DNA restriction fragments"

(85) Y. L. Lyubchenko, M. D. Frank - Kamenetskii,
A. V. Vologodskii, V. S Lazurin, G. G. Gause,
Biopolymers 15, 1019 - 1036, (1976).
"Fine structure of DNA melting curves"

(86) W. S. Yen, R. D. Blake,
Biopolymers 20, 1161 - 1181, (1981).
"Analysis of high - resolution thermal dispersion profiles of DNA: Treatment as a collection of discrete subtransitions"

(87) M. Weissbluth,
Quart. Rev. Biophys. 4, 1 - 34, (1971).
"Hypochromism"

(88) A. Wada, S. Yabuki, Y. Husimi,
CRC Critical Reviews in Biochemistry 9, 87 - 144, (1980).
"Fine structure in the thermal denaturation of DNA: High temperature - resolution spectrophotometric studies"

(89) A. Pullman, B. Pullman,
Quart. Rev. Biophys. 14, 289 - 380, (1981).
"Molecular electrostatic potential of the nucleic acids"

(90) M. Troll, B. H. Zimm,
J. Phys. Chem. 87, 3197 - 3201, (1983).
"Dielectric saturation effects in cylindrical poly-electrolytes"

(91) G. S. Manning,
Quart. Rev. Biophys. 11, 179 - 246, (1978).
"The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides"

(92) M. T. Record, C. F. Anderson, T. M. Lohman,
Quart. Rev. Biophys. 11, 103 - 178, (1978).
"Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids"

(93) R. D. Blake, P. V. Haydock,
Biopolymers 18, 3089 - 3109, (1979).
"Effect of sodium ion on the high resolution melting of lambda DNA"

(94) T. Marmur, P. Doty,
J. Mol. Biol. 5, 109 - 118, (1962).
"Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature"

(95) O. Gotoh, A. Wada, S. Yabuki,
Biopolymers 18, 805 - 824, (1979).
"Salt concentration dependence of melting profiles of lambda DNA's: Evidence for long - range interactions and pronounced end effects"

(96) W. Hillen, G. Klock, J. Kaffenberger, L. V. Wray, W. S. Reznikoff,
J. Mol. Biol. Chem. 257, 6605 - 6613, (1982).
"Purification of the TET - repressor and TET - operator from the transposon Tn10 and characterization of their interaction"

(97) W. Hillen, R. D. Klein, R. D. Wells,
Biochemistry 20, 3748 - 3756, (1981).
"Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments"

(98) W. Hillen, T. C. Goodman, (1983),
Persönliche Mitteilung

(99) S. M. Johnson, A. D. Bangham, M. W. Hill, E. D. Korn, Biochim. Biophy. Acta 233, 820 - 826, (1971). "Single bilayer liposomes"

(100) Gel Chromatography, Biorad Laboratories, Richmond, California 1975.

(101) Y. Nozaki, D. D. Lasić, C. Tanford, J. A. Reynolds, Science 217, 366 - 367, (1982). "Size analysis of phospholipid vesicle preparations"

(102) P. F. Lurquin, R. E. Sheehy, N. A. Rao, FEBS Lett. 125, 183 - 187, (1981). "Quantitative aspects of nucleic acids sequestrations in large liposomes and their effects on plant protoplasts"

(103) W. Hillen, B. Unger, Nucl. Acids Res. 10, 2685 - 2700, (1982). "Correlation of thermodynamic and genetic properties in the Tn10 encoded TET - gene control region"

(104) H. Krakauer, J. M. Sturtevant, Biopolymers 6, 491 - 512, (1968). "Heats of the helix - coil transition of the poly A·poly U complexes"

(105) H. J. Galla (1983), Persönliche Mitteilung

(106) D. Papahadjopoulos, W. J .Vail, K. Jacobson, G. Poste, Biochim. Biophys. Acta 394, 483 - 491, (1975). "Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles"

(107) D. Deamer, A. D. Bangham, Biochim. Biophys. Acta 443, 629 - 634, (1976). "Large liposomes by an ether evaporation method"

(108) M. H. W. Milsmann, R. A. Schwendener, H.-G. Weder, Biochim. Biophys. Acta 512, 147 155, (1978). "The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis"

(109) G. Maierhofer,
GIT, Fachzeitschrift für das Laboratorium
27, 266 - 270, (1983).
"Liposomen - Präparation und Anwendung"

(110) F. A. Manzoli, J. H. Muchmore, B. Bonova, A. Sabioni, S. Stefoni,
Biochim. Biophys. Acta 277, 251 - 255, (1972).
"Interaction between sphingomyelin and DNA"

(111) V. A. Parsegian,
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 2, 221 - 255, (1973).
"Long - range physical forces in the biological milieu"

(112) B. H. Zimm, M. Le Bret,
J. Biomol. Struct. Dyn. 1, 461 - 471, (1983).
"Counter - ion condensation and system dimensionality"

(113) M. Le Bret, B. H. Zimm,
Biopolymers 23, 271 - 285, (1984).
"Monte Carlo determination of the distribution of ions about a cylindrical polyelectrolyte"

(114) G. M. Torrie, J. P. Valleau,
J. Chem. Phys. 73, 5807 - 5816, (1980).
"Electrical double layers. I. Monte Carlo study of a uniformly charged surface"

(115) A. Höpfner,
"Irreversible Thermodynamic für Chemiker" p.82 - 87,
Walter de Gruyter, Berlin, 1976.

(116) H. Joenje, W. N. Konings, G. Venema,
J. Bacteriol. 119, 784 - 794, (1974).
"Interaction between exogeneous deoxyribonucleic acid and membrane vesicles isolated from Bacillus subtilis 168"

(117) C. Altenbach, J. Seelig,
Biochem. (1984), in press.
"Ca^{++} binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance"

(118) U. Zimmermann, P. Schuerich, G. Pilwat, R. Benz,
Angew. Chem. 93, 332 - 351, (1981).
"Zellen mit manipulierten Funktionen: Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik"

(119) E. Weidekamm, C. Schucht, D. Brdiczka,
Biochim. Biophys. Acta 443, 169 - 180, (1976).
"Physical properties of muscle cell membranes during fusion: A fluorescence polarization study with the ionophore A 23187"

(120) W. Hillen, B. Unger,
Nature 297, 700 - 702, (1982).
"Binding of four repressors to double - stranded TET operator region stabilizes it against thermal denaturation"

(121) M. Argast, C. F. Beck, (1984),
Persönliche Mitteilung

(122) J. Rosenbusch (1984),
Persönliche Mitteilung

Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, den 10. Mai 1984

Bernhard Brosius

Lebenslauf

Name:	Bernhard Brosius
geb.:	08. 09. 1954
Vater:	Herbert J. Brosius
Mutter:	Elisabeth W. Brosius, geb. Baumert

Schulbildung:

1961 - 1965	Eisgrubschule, Mainz
1965 - 1973	Gymnasium am Kurfürstlichen Schloß, Mainz
1973	Reifeprüfung

Studium:

1973	Beginn des Chemiestudiums an der Johannes Gutenberg Universität, Mainz
1976	Vordiplom
1978	Diplomhauptprüfung Chemie
1978 - 1980	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg Universität, Mainz (Leitung: Prof. Dr. H. Sillescu)
1980	Beginn der Dissertation am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule, Darmstadt (Leitung: Prof. Dr. D. Riesner)
1980/1981	Wechsel mit Prof. Dr. D. Riesner an das Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf